

Die Spezies-Barriere für die Übertragung von Prion-Krankheiten kann durch die Erzeugung transgener Spezies (hier einer Maus, die das Hamster-Prion-Protein exprimiert) überwunden werden. Dies belegt die Abnahme der Inkubationszeit bei der Infektion mit Spezies-fremdem Prion: Gestrichelte Pfeile stehen für niedrige oder keine Suszeptibilität für Prion-Krankheiten, fette Pfeile für hohe.

Chemie und Molekularbiologie der übertragbaren spongiformen Encephalopathien**

Frank Edenhofer, Stefan Weiss, Ernst-Ludwig Winnacker* und Michael Famulok*

Prion-Krankheiten, zu denen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen, die Scrapie des Schafes (auch Träberkrankheit) sowie die spongiforme Encephalopathie des Rinds (der sogenannte Rinderwahnssinn) zählen, stehen derzeit im Brennpunkt des öffentlichen Interesses. Wegen des Aussehens der Läsionen im Gehirn spricht man auch von schwammartigen Encephalopathien. Prion-Krankheiten werden wahrscheinlich durch einen von Nucleinsäuren

unabhängigen Erreger hervorgerufen. Nach dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft wird als Erreger eine strukturelle Isoform des Prion-Proteins angesehen, die Scrapie-Form PrP^{Sc} . Diese unterscheidet sich von der normalen zellulären Isoform PrP^{C} nicht in der Aminosäuresequenz, vermutlich aber in der Raumstruktur. Nach einer weithin akzeptierten Hypothese wird die normale Isoform des Proteins bei Kontakt mit der Scrapie-Isoform in einer Art autokata-

lytischem Prozeß ebenfalls in die Scrapie-Form umgewandelt. Ein eindeutiger Beweis für diese Hypothese steht allerdings noch aus. Bei der Bearbeitung der vielen offenen Fragen zur Prion-Problematik wurden jedoch in jüngster Zeit bemerkenswerte Fortschritte erzielt, über die hier berichtet wird.

Stichworte: Creutzfeldt-Jakob-Krankheit · Gentechnik · Prion-Protein · Protein-only-Hypothese · Proteinstrukturen

1. Einleitung

Die „Zinnpest“ ist ein bemerkenswertes Phänomen, das gewisse Analogien zu noch bemerkenswerteren Krankheitsformen, den übertragbaren schwammartigen Encephalopathien (engl. transmissible spongiform encephalopathies, TSEs), aufweist. TSEs werden durch proteinartige infektöse Partikel, sogenannte Prionen, übertragen, die in amyloiden Ablagerungen in den Gehirnen erkrankter Organismen enthalten sind. Man geht heute davon aus, daß das infektöse Agens eine strukturelle Isoform des vom Wirtsorganismus codierten zellulären Prion-Proteins ist. Bei einer Infektion gelangt das infektöse Agens ins Gehirn, zwingt die zelluläre Isoform zu einer Strukturänderung und wandelt so mehr und mehr Moleküle dieser Art in ihre tödliche Variante um. Verblüffend ähnlich verläuft die Zinnpest: Aus der Schmelze erstarrt Zinn als „normales“ metallisches β -Zinn, in dem jedes Sn-Atom verzerrt oktaedrisch von sechs weiteren Sn-Atomen umgeben ist. Bei Temperaturen unterhalb von ca. 13 °C kann sich metallisches β -Zinn in eine nichtmetallische Isoform, das kubische α -Zinn – ein graues Pulver – umwandeln. Dieser Übergang erfolgt normalerweise mit unendlich geringer Ge-

schwindigkeit. Wird aber das β -Zinn durch mikroskopisch kleine Staubteilchen des α -Zinns infiziert, so wirken diese als Kristallisationskeime für die Umwandlung der metallischen in die nichtmetallische pulvri ge Isoform. Diese zerstörerische Umwandlung, die bei sehr kostbaren Zinngegenständen besonders ärgerlich ist – man denke nur an die Wiener Kapuzinergruft – breitet sich wie eine ansteckende Krankheit immer weiter aus, weshalb der Name „Zinnpest“ dieses Phänomen recht anschaulich beschreibt.^[1]

Die Zinnpest erinnert in ihrem Mechanismus an die übertragbaren schwammartigen Encephalopathien, zu denen unter anderem die Scrapie des Schafes, die BSE des Rinds und die menschlichen Formen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), fatale familiäre Insomnie (FFI), Kuru und Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) zählen. Diese Krankheiten gehen alle mit amyloiden Ablagerungen in den Gehirnen erkrankter Organismen einher, aus denen sich die Prionen isolieren lassen.^[2, 3] Diese infektösen Proteinpartikel bestehen hauptsächlich – wenn nicht sogar vollständig – aus PrP^{Sc} (für Prion-Protein-Scrapie). PrP^{Sc} ist bezüglich der Aminosäuresequenz und der Ladungsverteilung identisch mit der nichtinfektösen Isoform dieses Proteins, dem zellulären Prion-Protein PrP^{C} .^[4] Ein signifikanter Anteil der infektösen Partikel besteht aus dem durch aminoterminale Proteolyse der Vorläuferform PrP^{Sc} entstandenen PrP^{27-30} . Man vermutet, daß das infektöse PrP^{Sc} (bzw. PrP^{27-30}) nach einem bisher unbekannten Mechanismus das zelluläre Prion-Protein PrP^{C} in seinesgleichen umwandelt, sich auf diese Weise vermehrt und schließlich den Krank-

[*] Prof. Dr. E.-L. Winnacker, Priv.-Doz. Dr. M. Famulok,
Dipl.-Chem. F. Edenhofer, Dr. Stefan Weiss
Institut für Biochemie der Universität
Feodor-Lynen-Straße 25, D-81377 München
Telefax: Int. + 89/74017448

[**] Die in diesem Aufsatz verwendeten Fachbegriffe werden im Anhang 1 erläutert.

heitsprozeß auslöst. Der Unterschied zwischen PrP^c und PrP^{Sc} könnte in den Tertiärstrukturen der beiden Isoformen liegen. Dabei wirkt PrP^{Sc} möglicherweise als Keim für die Umwandlung der „gesunden“ zellulären Form PrP^c in die Scrapie-Isoform PrP^{Sc}, die nach Art eines autokatalytischen Prozesses erfolgt. Die Prionen sind somit bislang einzigartige Erreger einer Infektionskrankheit, da ihre Vermehrung offenbar ohne die in Nucleinsäuren codierte Information auskommt und allein durch die Aminosäuresequenz und damit die Tertiärstruktur dieser Proteinklasse bestimmt wird.

Dieser Aufsatz faßt den neuesten Stand der Prionenforschung zusammen. Es werden aktuelle Hypothesen zur Vermehrung des Erregers der übertragbaren spongiformen Encephalopathien vorgestellt und kritisch diskutiert.

2. Pathologie von Prion-Krankheiten

2.1. Krankhafte Veränderungen

Die spongiforme Encephalopathie des Rinds (BSE) ist wegen ihres epidemieartigen Auftretens in Großbritannien eine der bekanntesten Formen der übertragbaren spongiformen Encephalopathien (TSEs). Tatsächlich kann diese Art der neurodegenerativen Erkrankung bei fast allen Säugetieren auftreten^[5] (Tabelle 1). Das auffälligste Merkmal sind die ungewöhnlich

Tabelle 1. Übertragbare spongiforme Encephalopathien

Name	Spezies	Ursache
Scrapie	Schaf, Ziege, Maus	Infektion
BSE[a]	Rind	Infektion
FSE[b]	Katze	Infektion
TME[c]	Nerz	Infektion
CWD[d]	Maultier, Hirsch, Elch	Infektion
CJD[e]	Mensch	sporadisch, genetisch, Infektion (iatrogen)
GSS[f]	Mensch	genetisch
FFI[g]	Mensch	genetisch
Kuru	Mensch	Infektion

[a] Bovine spongiforme Encephalopathie. [b] Feline spongiforme Encephalopathie. [c] Übertragbare Nerz-Encephalopathie. [d] Chronic wasting disease (Chronischer Kräftezerfall). [e] Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. [f] Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom. [g] Fatale familiäre Insomnie.

langen Inkubationszeiten: So liegen beispielsweise bei der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen im Mittel 15 Jahre zwischen der Ansteckung und dem Auftreten der ersten Symptome. Deshalb wurden diese Erkrankungen in den sechziger Jahren den „slow virus diseases“ zugeordnet. Nach dem heutigen Stand der Forschung ist es aber eher unwahrscheinlich, daß die spongiformen Encephalopathien auf Virus-Infektionen zurückzuführen sind (siehe Abschnitt 2.2.1). Da das Immunsystem auf die Infektion nicht reagiert,^[6] ist der infizierte Organismus den pathologischen Veränderungen schutzlos ausgesetzt. Als neurodegenerative Erkrankungen offenbaren TSEs ihr zer-

Michael Famulok, geboren 1960 in Fulda, studierte Chemie an der Universität Marburg. Dort promovierte er 1989. Es folgten zwei Postdoktorate in Cambridge (Massachusetts) und Boston, bevor er 1992 an das Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München ging, wo er sich 1996 habilitierte. Seine Forschungsgebiete umfassen die Aptamer-Technologie, die In-vitro-Selektion und In-vitro-Evolution von Ribozymen aus kombinatorischen Nucleinsäure-Bibliotheken, das Studium von Nucleinsäure-Ligand-Wechselwirkungen und die Prion-Forschung.



M. Famulok

Ernst-Ludwig Winnacker, geboren 1941 in Frankfurt, studierte Chemie an der ETH Zürich und promovierte 1968. Seit 1980 ist er Professor für Biochemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Zu seinen Arbeitsgebieten gehören die Biochemie von DNA-Reparatur- und Rekombinationsprozessen, die Vektorenentwicklung für Anwendungen der Gentherapie sowie die Prion-Forschung.



E.-L. Winnacker

Stefan Weiss studierte Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Er promovierte im Arbeitskreis von Roger Goody am Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung in Heidelberg über die Rekonstitution des HIV-1-Initiationskomplexes zur retroviralen cDNA-Synthese. Seit 1993 arbeitet er im Arbeitskreis von Ernst-Ludwig Winnacker an übertragbaren spongiformen Encephalopathien. Seit 1995 leitet er die Prion-Arbeitsgruppe am Genzentrum der LMU München.



S. Weiss

Frank Edelholz, geboren 1968 in München, studierte von 1989 bis 1994 Chemie an der LMU München. Seit 1995 arbeitet er im Arbeitskreis von Ernst-Ludwig Winnacker an seiner Dissertation über die Identifizierung und Charakterisierung von Prion-Cofaktoren und die heterologe Expression von PrP^c.



F. Edelholz

störerisches Potential im Gehirn der betroffenen Spezies. Neuropathologen diagnostizieren TSEs, wenn sie folgende Triade pathologischer Veränderungen erkennen: 1) eine schwammartige (spongiforme) Veränderung des Cortex (Abb. 1), die das

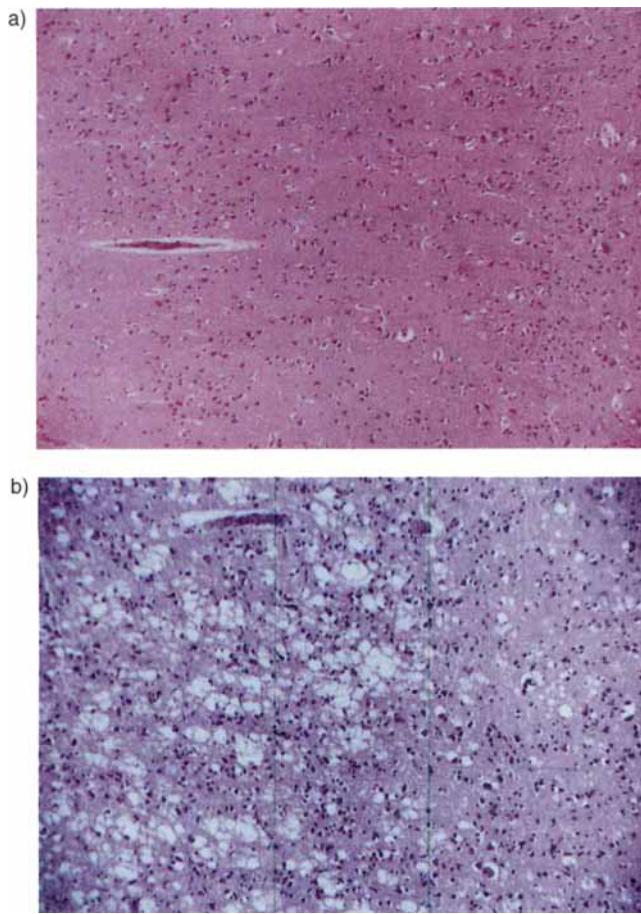


Abb. 1. Dünnschnitte vom Cortex eines gesunden Gehirns (a) und eines Gehirns eines an CJD verstorbenen Patienten (b). Die Durchlöcherung des Cortex (Spongiosis = schwammartige Veränderung) ist im zweiten Bild deutlich zu erkennen. Die Abbildungen wurden freundlicherweise von H. A. Kretzschmar (Institut für Neuropathologie, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Gehirn durchlöchert, 2) die krankhafte Vermehrung von Gliazellen (Gliose) und 3) das Absterben neuronaler Zellen^[7] verbunden mit der Ablagerung einer unlöslichen Isoform des Prion-Proteins, PrP^{Sc}. Diese pathologische Morphologie im Gehirn beispielsweise eines CJD-Patienten geht mit tiefgreifenden Störungen verschiedener Körperfunktionen einher. Im Elektroenzephalogramm (EEG) sind periodische Anomalitäten meßbar. Nach dem Auftreten der ersten Symptome wie Gedächtnisverlust, Sehschwierigkeiten und motorische Störungen führt die Krankheit über progressive Demenz innerhalb weniger Monate unweigerlich zum Tod. Es existieren keine therapeutischen Ansätze – eine gesicherte Diagnose am lebenden Organismus ist schwierig.

2.2. Das Pathogen

2.2.1. Virino-Hypothese

TSEs weisen viele Merkmale von viralen Infektionskrankheiten auf. So sind allein für die im Tierversuch meist verwendete

Mauslinie C 57 Bl/6 mindestens acht TSE-Stämme bekannt, die sich in spezifischen Eigenschaften wie Inkubationszeiten, Art und Verteilung der Schädigungen sowie mehreren anderen biochemischen Charakteristika unterscheiden.^[8, 9] Infiziert man genetisch identische (isogene) Mäuse mit den Isolaten verschiedener Scrapie-Stämme, so werden unterschiedliche Inkubationszeiten beobachtet. Diese Stämme werden durch Infektion von Versuchstier zu Versuchstier weitergegeben („passagiert“), ohne ihre charakteristischen Krankheitsparameter zu verändern.^[10] Die Stammspezifität innerhalb einer Spezies spricht eigentlich für vererbbarre Informationen und somit für die Beteiligung genetischer Komponenten am Vermehrungsprozeß. Bislang sind allerdings sämtliche Versuche mißlungen, ein für TSE-Infektionen verantwortliches Virus zu identifizieren. Ein Virus besteht üblicherweise aus einem Protein- und einem Nucleinsäureanteil. Der Proteinanteil schützt das virale Genom vor äußeren chemischen oder mechanischen Einflüssen und ermöglicht in einigen Fällen auch das Eindringen des Viruspartikels in die Wirtzelle. Das genetische Material (und damit das infektiöse Potential) eines Virus wird hingegen von der Nucleinsäure repräsentiert. Sie codiert den Bauplan derjenigen Proteine, die für die Virusreplikation in der Wirtzelle nötig sind. Die Hypothese, daß Viren TSEs übertragen können, wird heute nur noch von wenigen Wissenschaftlern vertreten (Abb. 2 A). Seit vielen Jahren versuchen die Protagonisten der Virino-Hypothese (zu ihnen zählen z. B. Laura Manuelidis und Heino Diringer^[11]) vergeblich, ein solches Virus zu finden. Diringer glaubt, einen morphologischen Hinweis auf die Existenz eines solchen Virus gefunden zu haben, da in seinem Labor elektronenmikroskop-

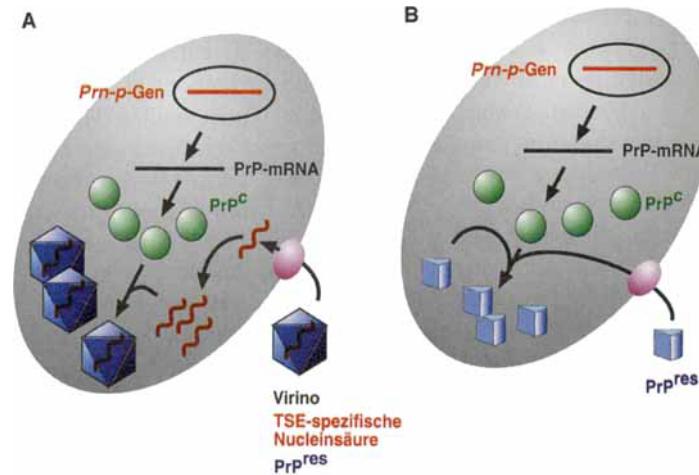


Abb. 2. Modelle zur Prion-Replikation. A) Das Virino-Modell geht davon aus, daß sich der Scrapie-Erreger aus einer TSE-spezifischen Nucleinsäure und der Proteinase-resistenten Form des Prion-Proteins, PrP^{res}, zusammensetzt. Das eigentliche infektiöse Agens, die (bisher) nicht identifizierte Nucleinsäure (rote Schlangenlinie), wird durch die Umhüllung mit dem schwerlöslichen, besonders widerstandsfähigen PrP^{res} (blau) geschützt. Das Virino-Partikel dringt in die Zelle ein (möglicherweise über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose; der putative Rezeptor ist violett dargestellt) und setzt die Nucleinsäure frei. Diese repliziert sich mit Hilfe des zellulären Replikationsapparates, und die Tochtermoleküle können mit zellulärem PrP zu neuen Virionen assoziieren. Dabei wird in der Wirtzelle codiertes und synthetisiertes PrP^c (grüne Kugeln) in PrP^{res} umgewandelt. B) Das „Protein-only“-Modell geht davon aus, daß sich der TSE-Erreger ohne Beteiligung von Nucleinsäuren vermehrt. Das infektiöse Partikel, das „Prion“, ist identisch mit PrP^{res}. Nach diesem Modell dringt exogenes PrP^{res} in die Zelle ein (auch hier ist die Beteiligung eines spezifischen Rezeptors anzunehmen) und wandelt zelluläres PrP^c durch direkte Interaktion mit PrP^{res} um. Das neu entstandene PrP^{res} ist seinerseits „infektiös“ und kann in einem autokatalytischen Cyclus noch vorhandenes PrP^c in PrP^{res} umwandeln.

pisch kleine symmetrische Strukturen in Scrapie-infizierten Hamster-Hirnen beobachtet wurden.^[12] Später konnten ähnliche Strukturen auch in den Hirnen verstorbener CJD-Patienten identifiziert werden.^[13] Diese in Kontrollgeweben von gesunden Organismen nicht nachweisbaren Partikel haben einen Durchmesser von 10–12 nm. Würde es sich bei diesen Strukturen tatsächlich um Viren handeln, so wären sie deutlich kleiner als das mit 17 nm Durchmesser bisher kleinste bekannte autonome Virus, das „Porcine-circo“-Virus.^[14]

Die kleinsten bekannten Pathogene überhaupt sind Viroide, kleine ringförmige RNA-Moleküle aus ca. 300 Nucleotiden, die Pflanzen befallen können.^[15–19] Eine systematische Suche nach derartigen Nucleinsäuren in infektiösen Scrapie-Proben wurde unter anderem von der Gruppe um Detlev Riesner in Düsseldorf durchgeführt.^[20, 21] Dabei ließen sich in infektiösen Präparationen zwar Nucleinsäuren identifizieren, ihre maximale Größe betrug aber nur 80 Nucleotide.^[21] Damit wäre das Genom eines hypothetischen Virus oder Viroids um ein Vielfaches kleiner als das bekannter Viren. Riesner et al. interpretieren diese Befunde dahingehend, daß die Existenz eines Scrapiespezifischen Virus als sehr unwahrscheinlich einzuschätzen ist.^[2, 22, 23]

2.2.2. „Protein-only“-Hypothese

Der Umstand, daß bisher kein TSE-Virus identifiziert werden konnte, ist allerdings kein Beweis dafür, daß ein solches Virus nicht existiert. Wie schwierig es sein kann, Erreger viraler Krankheiten zu identifizieren, zeigt z. B. die Tatsache, daß die Identifizierung des Hepatitis-C-Erregers als Virus trotz intensiver Forschungsbemühungen zehn Jahre gedauert hat.^[24] Es gibt aber noch weitere deutliche Hinweise darauf, daß Nucleinsäuren an einer Vermehrung des TSE-Erregers nicht beteiligt sein können. Schon in den sechziger Jahren stellten Tikvah Alper et al. fest, daß Scrapie-Proben gegenüber Nucleasen und UV-Strahlung resistent sind.^[25] Unter diesen Bedingungen werden Nucleinsäuren normalerweise inaktiviert. War dieser Befund bereits ungewöhnlich, so erstaunte noch mehr die Tatsache, daß unter Bedingungen, die im allgemeinen Proteine denaturieren (z. B. 8 M Harnstoff, Phenol), die Infektiosität verlorenging. Dieses ungewöhnliche Verhalten des Scrapie-Erregers führte schon damals zu ersten vorsichtigen Spekulationen über eine mögliche Existenz infektiöser Proteine, wie der Titel einer Publikation von Alper et al.^[26] erkennen läßt: „Does the scrapie agent replicate without nucleic acid?“ Dieser unorthodoxe Ansatz hatte sich aber zunächst gegen die Front des hergebrachten Wissens über Infektionskrankheiten nicht durchsetzen können. Wie sollte sich denn ein infektiöser Erreger im Wirt ohne Nucleinsäure replizieren? Kann sich ein Protein alleine vervielfältigen? Das klassische Dogma der Molekularbiologie – der Fluß der genetischen Information von der Nucleinsäure zum Protein – scheint hier verletzt zu sein.

S. Griffith formulierte bereits 1967 den möglichen Mechanismus eines sich selbst replizierenden Proteins, das Scrapie verursacht.^[27] Diesem Denkansatz verhalf Stanley Prusiner mit einer Reihe von Experimenten zum Durchbruch, die den Zusammenhang zwischen einem Protein und der Infektiosität

deutlich machten. So wurde in seinem Labor erstmals gezeigt, daß die Infektiosität der Präparationen zunahm, wenn man ein spezifisches Protein in ihnen anreicherte. Die Konzentration des Proteins war dabei proportional zum Titer der Infektiosität im Tierversuch.^[28, 29] Die logische Konsequenz aus der Interpretation dieser Ergebnisse war die Formulierung der „Protein-only“-Hypothese (Abb. 2 B), bei der für den neuartigen Erreger der Begriff „Prion“ eingeführt wurde, die plakative Kurzform für ein proteinartiges infektiöses Partikel (engl. proteinaceous infectious particle).^[30] Die Reinigung und eingehende biochemische Untersuchung dieses bemerkenswerten Proteins aus den Gehirnen infizierter Tiere gelang Prusiners Gruppe in mehrjähriger Laborarbeit. Die weitergehende Charakterisierung des Erregers brachte das überraschende Ergebnis, daß zu dem pathogenen Protein ein zelluläres Homolog existiert. Prusiners Gruppe gelang es zusammen mit der Gruppe um Charles Weissmann in Zürich, das dafür codierende wirteigene Gen (*Prn-p*) zu klonieren und zu sequenzieren.^[31, 32] Das als zelluläres Prion-Protein (kurz *PrP^c*) bezeichnete Protein wird in jedem gesunden Säugetier – vor allem in Gehirn – exprimiert, ohne daß der Organismus Schaden dabei nimmt. Heute wissen wir, daß das Prion-Protein ein biochemisches Doppel Leben führt. Es existiert einerseits in einer gesunden zellulären Form (*PrP^c* – „c“ für zellulär), deren biologische Bedeutung für den Organismus noch unklar ist (siehe Abschnitt 5.3.2), andererseits in einer pathogenen, möglicherweise infektiösen Form (*PrP^{Sc}*, selten auch *PrP^{res}* – „Sc“ für Scrapie, „res“ für Proteinase-K-resistent), die für den betroffenen Organismus unausweichlich den Tod bedeutet. Ein besonders überzeugendes Argument für die Protein-only-Hypothese lieferte die Gruppe um Weissmann mit der Herstellung transgener Mäuse, bei denen das *Prn-p*-Gen zerstört wurde, so daß sie kein *PrP* mehr exprimieren (vgl. Abschnitt 5.3). Diese *PrP*-knock-out-Mäuse sind resistent gegenüber Scrapie-Infektionen.^[33] Die Protein-only-Hypothese widerspricht ohne Zweifel der über lange Jahre akzeptierten Hypothese, daß die Aminosäuresequenz eines Proteins die einzige Determinante für seine biologisch relevante dreidimensionale Struktur ist.^[34]

So überzeugend die Argumente für die Protein-only-Hypothese auch sein mögen, der letzte experimentelle Beweis für die Infektiosität des Prion-Proteins steht noch aus. Die Protagonisten der Protein-only-Hypothese sehen darin lediglich ein präparatives Problem, denn gereinigte Proben enthalten unter 10^5 *PrP^{res}*-Molekülen nur eine infektiöse Einheit,^[22] so daß sich die Analyse der infektiösen Anteile entsprechend schwierig gestaltet. Kritiker der Protein-only-Hypothese behaupten, die Bildung von Proteinase-K-resistentem *PrP^{res}* sei lediglich eine Begleiterscheinung von TSEs, ein pathologisches Produkt der Infektion mit einem bisher nicht identifizierten Virus. Auch diese Argumentation kann durchaus experimentell gestützt werden. So berichteten kürzlich Lasmézas et al., daß mit BSE-Proben infizierte Mäuse zwar TSE-ähnliche Symptome ausbilden, daß aber in 55% der Fälle kein Proteinase-K-resistentes *PrP^{res}* in den Gehirnen der Versuchstiere nachgewiesen werden konnte.^[35] Diese und ähnliche Befunde zeigen, daß das Prion-Protein zweifellos eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von TSEs spielt – ob es als alleiniges infektiöses Agens dieser Krankheiten gelten kann, ist aber bis zum heutigen Tag keinesfalls bewiesen.

3. PrP^c und PrP^{Sc}: Unterschiede und Gemeinsamkeiten

Für das Auftreten der spongiformen Encephalopathien scheint das Prion-Protein von entscheidender Bedeutung zu sein. In Säugern (und auch in einigen Vogelarten) wird das Protein vor allem im Gehirn exprimiert. Wie bei vielen hochkonservierten Proteinen wird auch im Fall des Prion-Proteins davon ausgegangen, daß es eine wichtige biologische Rolle spielt. Einer Reihe neuerer Hinweise zufolge könnte es für die normale Funktion der Synapsen^[36] oder für die Langzeitstabilität der Purkinje-Neuronen^[37] (große dendritische Ganglienzellen der mittleren Schicht der Kleinhirnrinde) und/oder auch für die Regulation der circadianen Rhythmik und des Schlafverhaltens^[38] wichtig sein (siehe hierzu ausführlicher Abschnitt 5.3.2).

Die folgenden Ausführungen zum Aufbau und zur Struktur des Prion-Proteins beziehen sich, wenn nicht anders erwähnt, auf den Syrischen Goldhamster. Diese Spezies eignet sich besonders gut zur experimentellen Untersuchung der TSEs, da die Inkubationszeit mit siebzig Tagen relativ kurz ist und außerdem streng mit der Infektiosität der Proben korreliert. Nach bisherigem Wissen läßt sich der Aufbau des Hamster-PrP mit geringen Modifikationen auch auf andere Säugetierarten übertragen.

3.1. Posttranskriptionale Modifikationen und Infektiosität

Die PrP-codierende Sequenz liegt vollständig innerhalb eines Exons des singulären *Prn-p*-Gens,^[32] so daß durch differentielles Spleißen bedingte PrP-Isoformen ausgeschlossen werden können. Durch Translation der PrP-mRNA entsteht zunächst ein PrP-Vorläufer aus 254 Aminosäuren (Abb. 3). Posttranskriptionale Modifikation führt dann zur Abspaltung eines aminoterminalen Signalpeptids (Aminosäuren 1–22)^[31, 32] und einer Signalsequenz aus 23 Aminosäuren am Carboxyterminus (Aminosäuren 232–254).^[22] Das Protein wird über den Serinrest 231 an einen Glycosylphosphatidylinosit(GPI)-Anker gebunden und dadurch in der Zellmembran verankert. Durch Phosphatidylinosit-Phospholipase C lässt sich PrP^c von der Zellmembran freisetzen.^[39] Eine für PrP charakteristische Region bilden die Reste 50–90. Hierbei handelt es sich um fünf hintereinanderliegende glicin- und prolinreiche Octapeptidsequenzen („G-P-repeats“). Polymorphismen in den G-P-repeats sind mit vererbaren Formen von TSE (Abschnitt 3.3) in Zusammenhang gebracht worden (genetischer Polymorphismus: innerhalb einer Population vorkommende Unterschiede im Genotyp mit einer nicht allein auf die Mutationsraten zurückzuführenden Häufigkeit). PrP wird an den Asparaginresten N181 und N197 glycosyliert^[40–42], und zwischen C179 und C214 wird eine Disulfidbrücke gebildet.^[4, 29, 43] Das resultierende reife PrP von 209 Aminosäuren Länge liegt in gesunden Tieren in der nichtinfektiösen PrP^c-Form vor. In infizierten Hamstern findet man darüber hinaus die PrP^{Sc}-Isoform, die über einen noch unbekannten Mechanismus gebildet wird.

Obwohl die Aminosäuresequenzen der beiden Isoformen PrP^c und PrP^{Sc} gleich sind, unterscheiden sich die Proteine in vielerlei Hinsicht signifikant: Als normales zelluläres Protein ist PrP^c im Gegensatz zu Präparationen, die PrP^{Sc} enthalten, nicht infektiös. Die Infektiosität von PrP^{Sc}-haltigen Proben bleibt

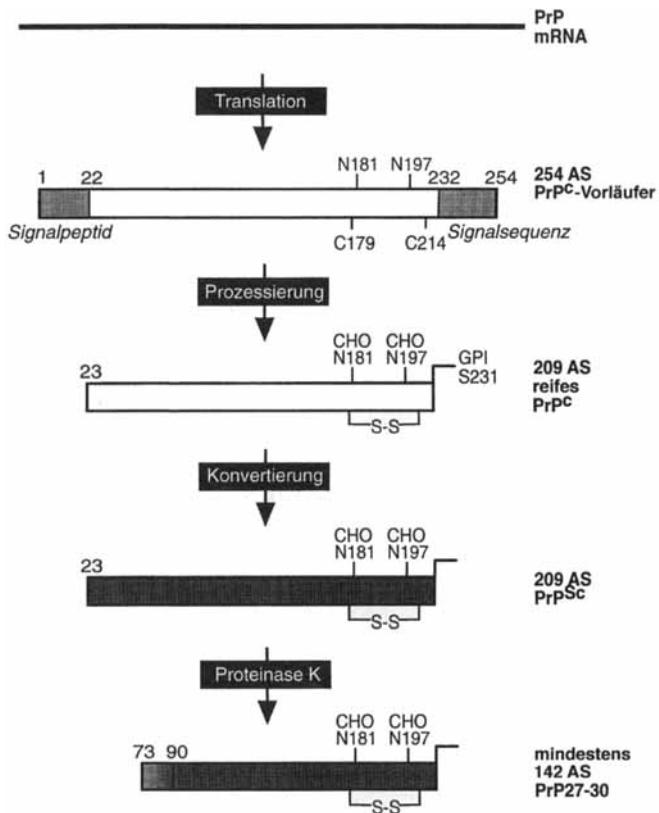


Abb. 3. Reifung von PrP^c des Syrischen Goldhamsters und Umwandlung in die Proteinase-K-resistenten Formen PrP^{Sc} und PrP27–30. PrP^{Sc} und PrP^c unterscheiden sich nicht in der Primärstruktur, wohl aber in ihrem Verhalten gegenüber Proteinase K: Während PrP^c vollständig abgebaut wird, bleibt von PrP^{Sc} ein Proteinase-resistenter Kern zurück, PrP27–30, dessen Zusammensetzung inhomogen ist. AS = Aminosäure.

auch unter Bedingungen erhalten, die normalerweise zur Inaktivierung von Nucleinsäuren und zum Teil auch von Proteinen führen, etwa beim Einwirken von Formaldehyd, UV- oder Röntgen-Strahlung oder beim Behandeln mit Nuclease oder Proteinase.^[31, 44, 45] Beim Erhitzen müssen wenigstens 130 °C erreicht werden, um die Infektiosität wirkungsvoll zu inhibieren. Auch durch Einwirken von NaOH- oder KOH-Lösung (2 N) über mehrere Stunden wird die Infektiosität gestoppt. Die Inkubation mit Proteinase K führt zu vollständigem Abbau von PrP^c, dagegen ist PrP^{Sc} diesem Enzym gegenüber partiell resistent.^[32, 45–48] Die Proteinase-resistente Fraktion setzt sich aus aminoterminal verkürzten Fragmenten zusammen, beginnend zwischen den Aminosäuren 73 und 90. Diese auch in hochinfektiösen Präparationen auftretende Form zeigt in denaturierenden Polyacrylamidgelen eine Mobilität, die einer Größe von 27–30 kDa entspricht; sie wird daher als PrP27–30 bezeichnet (Abb. 3). Einmal in der Zelle vorhandenes PrP^{Sc} wird im Gegensatz zu PrP^c nicht mehr abgebaut; es akkumuliert in sekundären Lysosomen, auf der Zelloberfläche oder extrazellulär.^[49]

Ein weiterer signifikanter physikalischer Unterschied zwischen den beiden Isoformen ist ihre Löslichkeit in vitro: PrP^c ist in nichtionischen Detergentien löslich, PrP^{Sc} dagegen nicht. Ausführliche Untersuchungen zur Löslichkeit gehen vor allem auf die Gruppe um Riesner zurück. Die Untersuchung mehrerer ionischer und nichtionischer Detergentien auf ihre Fähigkeit zur Solubilisierung von PrP27–30 ergab, daß bei der Ultraschallbe-

handlung gereinigter infektiöser Prion-Stäbchen in Gegenwart von 0.2- bis 0.3proz. Na-Dodecylsulfat (SDS) eine lösliche Fraktion entsteht, die nach einstündigem Ultrazentrifugieren bei 100 000 g nicht sedimentiert.^[50] Diese lösliche Fraktion enthielt – verglichen mit den aus PrP 27–30 bestehenden infektiösen Amyloidpolymeren – einen hohen Anteil α -helicaler Bereiche und einen geringen Anteil β -Faltblattstrukturen sowie sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 10 nm und einem Sedimentationskoeffizienten von 6S. Diese Partikel bestanden aus vier bis sechs PrP 27–30-Molekülen und waren nur schwach oder gar nicht infektiös. Infektiöse Präparationen des *löslichen* Prion-Proteins konnten auch in dieser Studie *nicht* erhalten werden. Behandelte man die Partikel mit 25- bis 30proz. Acetonitril, konnte der α -helicalen Anteil in β -Faltblattstrukturen überführt werden, wie anhand von Circular dichroismus(CD)-Messungen festgestellt wurde. Unter diesen Bedingungen aggregiert PrP 27–30 zu unlöslichen irregulären Polymeren und zeigt partielle Resistenz gegenüber einer Proteinase-K-Behandlung. Die Unlöslichkeit und die Aggregation der mit Acetonitril behandelten sphärischen Partikel wurden auf die Umwandlung in β -Faltblattstrukturen zurückgeführt. Morphologisch unterschieden sich diese PrP 27–30 Aggregate allerdings deutlich von den ursprünglich verwendeten Prion-Stäbchen aus den Gehirnen Scrapie-infizierter Hamster, sie besaßen auch keine Infektiosität. Proteinase-Resistenz muß demnach nicht unbedingt mit Infektiosität korrelieren.^[50]

3.2. Sekundär- und Tertiärstruktur

Die unterschiedlichen Löslichkeiten von PrP^c und PrP^{Sc} suggerieren Unterschiede in der Sekundär- oder Tertiärstruktur der beiden Isoformen.^[51] Tatsächlich ergaben CD-Messungen,^[52] Fourier-Transform-IR-Spektroskopie (FTIR)^[53] und Massenspektrometrie (MS)^[54] Hinweise auf deutliche Unterschiede in der Sekundärstruktur von PrP^c und PrP^{Sc}. Danach hat PrP^c einen Anteil von 42% α -helicaler Bereiche und lediglich 3% β -Faltblattstruktur. Dagegen liegt bei PrP^{Sc} der Anteil an α -Helices bei 30%, der an Bereichen mit β -Faltblattstruktur bei 45%.^[51, 52] Diesen Untersuchungen zufolge wird während der Konvertierung etwa die Hälfte der α -helicalen Bereiche von PrP^c in die β -Faltblattbereiche von PrP^{Sc} umgewandelt.^[52, 55] Wie sich PrP^c entfaltet und dann in PrP^{Sc} umfaltet, ist allerdings unbekannt. Möglicherweise weist die Veränderung der Proteinstruktur, die mit diesem Prozeß verbunden ist, eine hohe Aktivierungsenergie auf.^[51]

Computermodelle der dreidimensionalen Struktur des zellulären Prion-Proteins PrP^c wurden mit gängigen Methoden der Strukturvorhersage wie der Chou-Fasman-Methode und dem Garnier-Osguthorpe-Robson-Algorithmus erstellt.^[56] Dabei wurden die oben erwähnten spektroskopischen Daten sowie vergleichende Analysen der Gene unterschiedlicher Spezies berücksichtigt, um auch für die Scrapie-Isoform ein Strukturmodell zu erhalten.^[56, 57] PrP^c enthält nach diesem Modell ein aus vier (als H1 bis H4 bezeichneten) α -Helices bestehendes Helixbündel (Abb. 4B, 5A): H1 wird aus AS 109–122 gebildet, H2 aus AS 129–141, H3 aus AS 178–191 und H4 aus AS 202–218. Die Algorithmen liefern keine schlüssige Vorhersage für die Region aus AS 23–108, in der die Prion-Proteine die fünf cha-

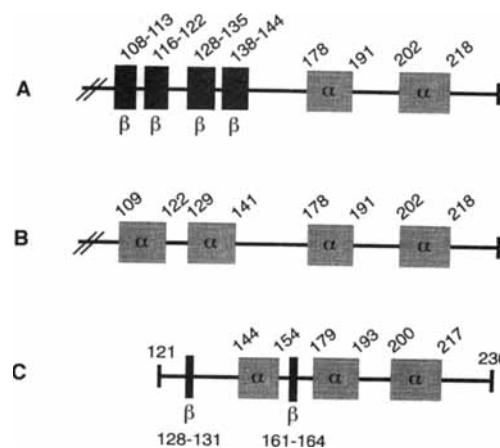


Abb. 4. Sekundärstrukturen von PrP^c und PrP^{Sc}. A) Computermodell für PrP^c (basierend auf genetischen Daten); B) Computermodell für PrP^c (mit Chou-Fasman-Methode und Garnier-Osguthorpe-Robson-Algorithmus berechnet); C) schematische Darstellung der durch NMR-Spektroskopie entschlüsselten Sekundärstruktur. Die beiden C-terminalen α -Helices konnten in ihrer Lage fast exakt bestätigt werden, während die durch NMR-Spektroskopie ermittelte Sekundärstruktur im Bereich AS 121–178 deutlich vom Computermodell abweicht (B, C). Das Modell für PrP^{Sc} besteht aus einer viersträngigen β -Faltblattstruktur im Bereich AS 108–144 und zwei C-terminalen α -Helices, die in ihrer Lage mit denen von PrP^c übereinstimmen (A, B). Für PrP^{Sc} liegen aufgrund der Schwerlöslichkeit des Proteins noch keine NMR-Daten vor. Die Abbildung basiert auf Daten aus Lit. [56, 57, 61].

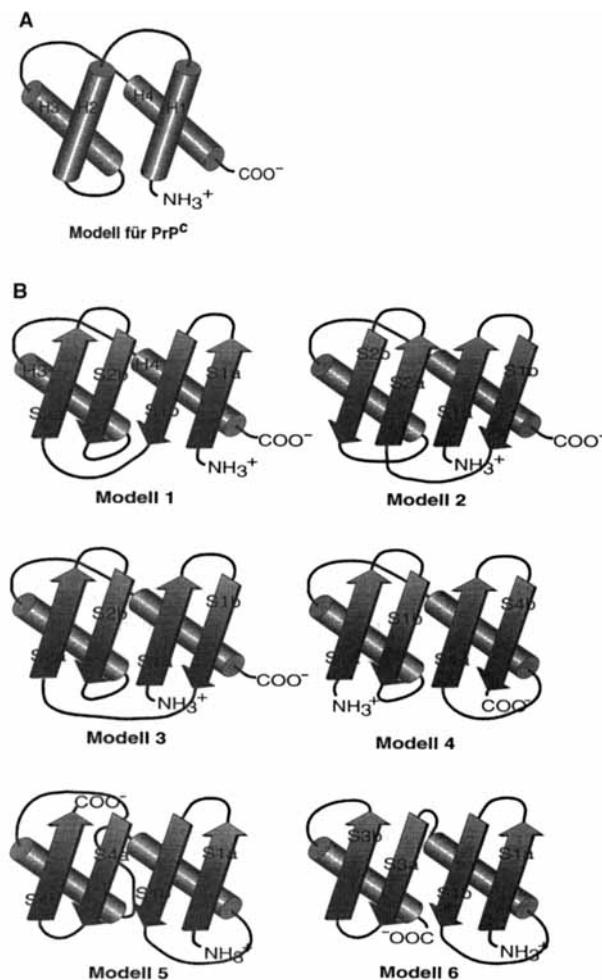


Abb. 5. A) Computer-berechnetes Strukturmodell für PrP^c, modifiziert nach Lit. [57]. Jeweils zwei Helices sind gegeneinander zu einem Viererbündel verdreht. B) Strukturmodelle für PrP^{Sc}. Modell 2 korrelierte am besten mit den genetischen Daten unterschiedlicher Spezies.

akteristischen tandemorientierten Octapeptidsequenzen enthalten. Für PrP^{Sc} werden 6 Strukturmodelle aus einer Liste von anfangs 10^6 vorgeschlagen (Abb. 5 B). Alle 6 enthalten eine viersträngige β -Faltblattstruktur, die auf einer Seite von zwei α -Helices abgedeckt wird.^[57] Unter diesen Modellen korreliert das Modell 2 am besten mit den genetischen Daten (vgl. Abb. 4 A). Die mit S1 bis S4 bezeichneten β -Faltblattregionen werden dann begrenzt durch die Aminosäuren 108–113/116–122 für S1a/S1b, 128–135/138–144 für S2a/S2b, 178–184/187–191 für S3a/S3b, und 202–210/213–218 für S4a/S4b. Die beiden Helices H3 und H4 entsprechen in ihrer Lage den Helices H3 und H4 in PrP^c. Nach diesem Strukturmodell sollen die Helices H1 und H2 während der Umwandlung von PrP^c in PrP^{Sc} zu jeweils zwei antiparallelen β -Faltblattstrukturen werden.^[57]

In früheren Experimenten waren bereits synthetische Peptide, die Teile des Prion-Proteins entsprachen, auf die oben genannten Strukturelemente untersucht worden. Von vier synthetischen Peptiden, die den Regionen H1–H4 entsprechen, waren drei verhältnismäßig wenig wasserlöslich. Spektroskopische (FTIR, CD) und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß sie β -Faltblattstrukturen bildeten und in Fibrillen polymerisieren konnten.^[58, 59] Dagegen ergaben CD- und NMR-spektroskopische Untersuchungen in organischen Lösungsmitteln wie Hexafluorisopropylalkohol (HFIP) oder Detergentien wie Natriumdodecylsulfat (SDS), daß sowohl H1 und H2 als auch längere Peptide, die die entsprechenden Helixregionen enthalten, α -Helices bilden können.^[60] Es scheint demnach durchaus plausibel, daß synthetische Peptide einige Aspekte der für das Prion-Protein vorgeschlagenen Konformationsunterschiede modellieren könnten.

Vor kurzem wurde die dreidimensionale Struktur einer Domäne von rekombinant hergestelltem Maus-PrP^c durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt.^[61] Um die erforderlichen hohen Mengen an Protein zu erhalten, wurde das Proteinfragment der Aminosäuren 121–231 der Maus im Periplasma von *E. coli* überexprimiert.^[62] Ursprünglich hatte man versucht, murines PrP 108–231 zu exprimieren; die Expression führte aber zu proteolytischer Spaltung an den Aminosäuren 112, 118 und 120, so daß das Protein erst ab der Position 121 stabil erhalten werden konnte. Aus vorausgegangenen Untersuchungen war bekannt, daß das Segment 81–231 von Maus-PrP für die Prion-Vermehrung in dieser Spezies ausreicht, was darauf hindeutet, daß die C-terminale Region des Proteins funktionell wesentlich bedeutsamer sein muß als die N-terminale.^[63] Obwohl der für die NMR-Strukturuntersuchung verwendeten Domäne PrP 121–231 somit ein ausgedehnter Bereich des N-Terminus (Fragment 81–120) fehlt, von dem man bislang noch nicht weiß, ob er für die Pathologie der Krankheit essentiell ist, enthält sie doch den größten Teil bestimmter Punktmutationen, die im Fall der menschlichen Prion-Krankheiten mit dem Auftreten familiärer Fälle in Zusammenhang gebracht werden (Abschnitt 4.3.2).^[64]

Die NMR-spektroskopisch bestimmte Sekundärstruktur von PrP 121–230 ist durch drei α -Helices und ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt charakterisiert (Abb. 4 C). Die Helices erstrecken sich über die Aminosäurereste 144–154, 179–193 und 200–217. H3 und H4 des früher vorgeschlagenen Strukturmodells^[56, 57] stimmen somit in ihrer Lage mit den beiden C-terminalen α -Helices der NMR-spektroskopisch bestimmten Struktur fast exakt überein (Abb. 4). Für H2 waren im Struk-

turmodell die Positionen 129–141, für H1 die Positionen 109–122 vorgeschlagen worden, die beide im „NMR-Fragment“ fehlen. Dafür tritt in diesem Bereich der NMR-spektroskopisch bestimmten Struktur eine extrem kurze antiparallele β -Faltblattstruktur an den Positionen 128–131 und 161–164 auf, die das PrP^c-Strukturmodell nicht vorhergesagt hatte. Diese Faltblattdomäne in PrP^c könnte bei der Umfaltung in PrP^{Sc} als Keim dienen. Bei der Sekundärstruktur ergeben sich Abweichungen vom Computermodell interessanterweise gerade im N-terminalen Bereich, in dem das für die NMR-Spektroskopie verwendete Fragment stark verkürzt war (siehe Abb. 4). Es bleibt abzuwarten, ob das Fehlen der Aminosäuren 23–120 deutliche Strukturveränderungen im N-Terminus zur Folge hat, oder ob nicht möglicherweise essentielle Elemente des Prion-Proteins in eben diesem Bereich liegen. In der durch NMR-Spektroskopie bestimmten Tertiärstruktur von PrP^c dominiert eine gegeneinander verdrehte V-förmige Anordnung der beiden C-ständigen Helices, in die die erste α -Helix und das β -Faltblatt eingelagert sind (Abb. 6).

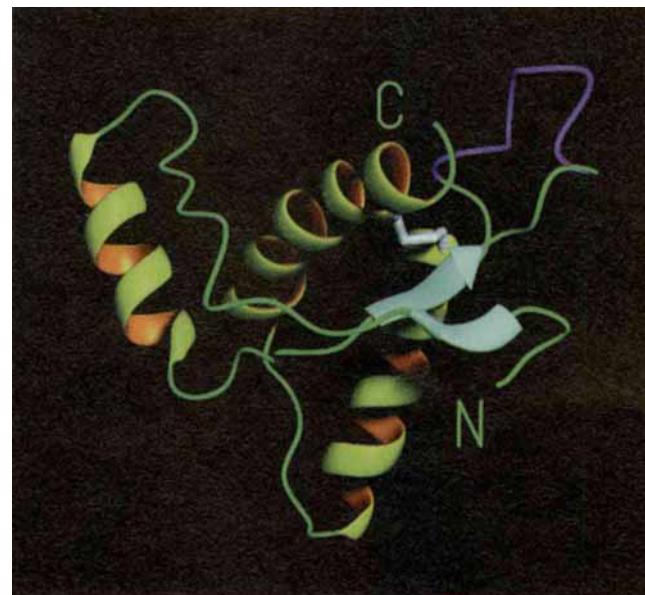


Abb. 6. Durch NMR-Spektroskopie entschlüsselte Struktur des Maus-PrP^c-Fragments AS 121–231, dargestellt als Bändermodell[61]. Das Fragment wurde rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt. Die Struktur enthält drei α -Helices (gelb) und ein doppelsträngiges antiparalleles β -Faltblatt (cyan). Die beiden C-ständigen Helices sind V-förmig gegeneinander verdreht und durch die Disulfidbrücke (weiß) zwischen C179 (erste Windung der zweiten Helix) und C214 (letzte Windung der dritten Helix) verbunden. Gegenüber ist die von den beiden β -Faltblättern (blau) flankierte N-ständige Helix angeordnet. Die kurzen antiparallelen β -Faltblätter könnten als Keim für die Bildung ausgedehnter Faltblattbereiche in PrP^{Sc} dienen.

Interessant wäre ein Vergleich der dreidimensionalen Struktur von PrP^c mit der von infektiösem PrP^{Sc} oder von PrP 27–30. Wegen der Unlöslichkeit der infektiösen Prion-Isoformen ist die Ermittlung einer hochaufgelösten dreidimensionalen Struktur mittels NMR-Spektroskopie in Lösung oder Kristallstrukturanalyse schwierig. Möglicherweise ist die Festkörper-NMR-Spektroskopie eine Technik, mit der die strukturelle Charakterisierung der unlöslichen Scrapie-Isoform des Prion-Proteins gelingen könnte. Dazu müßten allerdings wägbare Mengen an ¹³C- oder ¹⁵N-markiertem PrP^{Sc} hergestellt werden, was bislang

technisch nicht möglich ist.^[65] Erste Experimente in dieser Richtung wurden mit dem ¹³C-angereicherten PrP-H1-Fragment von Hamster-PrP, bestehend aus den Aminosäuren 109–122 (Sequenz: MKHMAGAAAAGAVV), durchgeführt.^[66] Diese Studie lieferte einen weiteren Hinweis darauf, daß sich H1 tatsächlich von der α -Helix- in die β -Faltblattstruktur umwandeln kann: Wurde das Peptid in einer Lösung in 50% Acetonitril/Wasser lyophilisiert, ergab das Festkörper-NMR-Spektrum für die Region 112–121 chemische Verschiebungen, die für β -Faltblattstrukturen charakteristisch sind. Lyophilisate aus HFIP zeigten dagegen Verschiebungswerte, die auf eine α -helicale Sekundärstruktur der Region 113–117 hinwiesen. Eine komplettete Umwandlung in die helicale Konformation konnte nicht festgestellt werden. Die Rückfaltung der α -helicalen Form in die β -Faltblattstruktur gelang durch Auflösen der Proben in Wasser. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit der experimentellen Beobachtung, daß PrP in unterschiedlichen Konformatio-nen vorliegen kann, und mit Strukturvorhersagen auf der Basis biologischer Daten und berechneter Modelle, nach denen H1 eine wichtige Rolle für die Konformationsunterschiede zwischen PrP^c und PrP^{Sc} spielt.

3.3. Modelle zum Mechanismus der Prion-Vermehrung

Es stellt sich nun die Frage, nach welchem Mechanismus sich PrP^{Sc} in der Wirtzelle ohne Beteiligung von Nucleinsäuren vermehrt. Die Protein-only-Hypothese geht davon aus, daß wirteigenes PrP^c über die Einwirkung von exogenem (z. B. oral aufgenommenem) PrP^{Sc} in PrP^{Sc} umgewandelt wird. Die beiden derzeit konkurrierenden Modelle unterscheiden sich hinsichtlich der (Quartär-)Struktur der infektiösen Einheit.

3.3.1. Heterodimer-Hypothese

Nach der Heterodimer-Hypothese von Prusiner^[22] bilden sich zunächst PrP^{Sc}-PrP^c-Heterodimere. PrP^c wird dabei partiell entfaltet und unter Einwirkung von PrP^{Sc} zurückgefaltet, wobei ein PrP^{Sc}-Homodimer entsteht (Abb. 7 A). In einem autokatalytischen Cyclus kann das neu gebildete PrP^{Sc} wiederum die Umwandlung von PrP^c induzieren. Unter geeigneten Bedingungen aggregiert das entstandene PrP^{Sc} zu elektronenmikroskopisch sichtbaren Fibrillen oder zu amyloiden Plaques. Die Energiebarriere für die Umwandlung der PrP-Isoformen ineinander ist wahrscheinlich relativ hoch.^[46] Deswegen tritt sie bei spontanen Formen der Krankheit – wenn überhaupt – erst im hohen Alter auf (Abb. 7 A; gestrichelte Linie). Bei erblichen Formen könnte die PrP^{Sc}-Bildung durch spezifische Mutationen, die die Bildung von β -Faltblattstrukturen begünstigen, erleichtert werden. Die pathologischen Veränderungen werden dabei möglicherweise entweder durch das Fehlen der PrP^c-Form oder durch das massive Auftreten von unlöslichem PrP^{Sc} hervorgerufen.

Dieses Modell liefert befriedigende Erklärungen für die Bildung von PrP^{Sc}, läßt aber offen, wie es möglich ist, daß ein PrP^{Sc} viele unterschiedliche Stämme von Prion-Krankheiten übertragen kann. Denn wie bereits geschildert (Abschnitt 2.2.1), existieren selbst innerhalb ein und derselben Spezies unterschiedliche PrP^{Sc}-Stämme mit eindeutig identifizierbaren und „vererbaren“ Charakteristika.^[67–70] Dieses Phänomen ist ein massi-

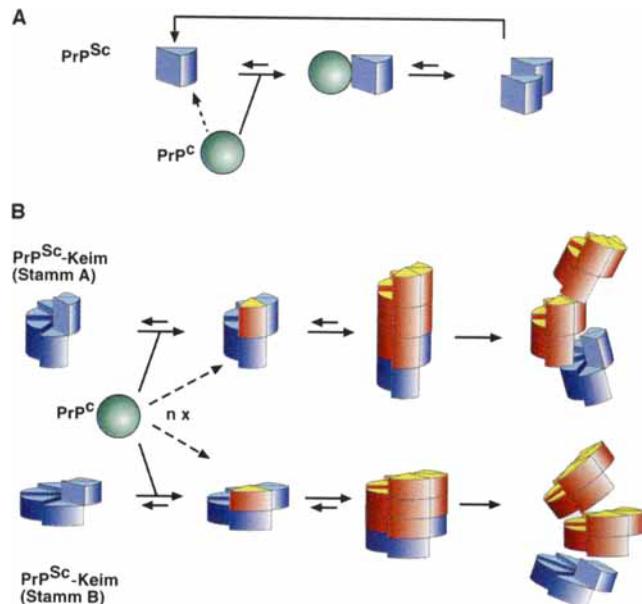


Abb. 7. Modelle zur Umwandlung von PrP^c in PrP^{Sc}. A) Das Heterodimer-Modell^[22] postuliert die Bildung von Dimeren aus infektiösem PrP^{Sc} (blau) und zellulärem PrP^c (grün), die partielle Entfaltung von PrP^c und dessen Rückfaltung in PrP^{Sc}, das seinerseits in einem autokatalytischen Cyclus die Bildung von PrP^{Sc} bewirken kann. Wegen der hohen Energiebarriere der Umwandlung von PrP^c in PrP^{Sc} ist die spontane Bildung von PrP^{Sc} (gestrichelte Linie) sehr unwahrscheinlich. B) Im Modell der kernabhängigen Polymerisation^[74] wird die infektiöse Einheit durch ein PrP^{Sc}-Oligomer (blau) repräsentiert, das als Keim für die Polymerisation von PrP zu hochmolekularen fibrillären Aggregaten dient. Zelluläres PrP (grün) kann sich sukzessive an diesen Keim anlagern und dessen Struktur adaptieren (rot). Das Polymer läßt sich wieder in Keime teilen, die ihrerseits eine kernabhängige Polymerisation auslösen können. Das Auftreten unterschiedlicher Scrapie-Stämme wird in diesem Modell damit erklärt, daß jede (Quartär-)Struktur eines Keims die spezifischen Charakteristika unterschiedlicher Scrapie-Stämme (hier Stamm A und Stamm B) „codiert“.

ves Gegenargument gegen die Hypothese, nach der die Prion-Vermehrung allein durch Proteinfaktoren ohne genetische Komponenten erfolgt. Die Vererbarkeit der beobachteten Stammspezifität ohne genetische Information ist im Zusammenhang mit dieser Hypothese problematisch, da dann eigentlich nicht nur *zwei* metastabile Zustände für das Prion-Protein existieren müßten, sondern *viele* PrP-Strukturen, die jede für sich einen spezifischen Stamm „codieren“ kann. Das Problem der stammspezifischen Übertragung verlangte deshalb nach einer erweiterten Hypothese und führte schließlich zum Modell der kernabhängigen Polymerisation.

3.3.2. Kernabhängige Polymerisation

Die Idee eines kristallartigen Wachstums von Prion-Polymeren wurde bereits 1990 von der Gruppe um D. Carleton Gajdusek beschrieben.^[71] Peter Lansbury et al. formulierten später einen analogen Mechanismus,^[72, 73] den sie zusammen mit Byron Caughey zum Modell der kernabhängigen Polymerisation entwickelten (Abb. 7 B).^[74] Dieses unterscheidet sich vom Heterodimer-Modell durch die Annahme, daß eine infektiöse Einheit aus einem PrP^{Sc}-Oligomer besteht, das als Keim für eine Polymerisation wirkt. Wirteigenes PrP^c kann sich sukzessive über einen mehr oder weniger entfalteten Übergangszustand an diesen Keim anlagern und dabei dessen spezifische Struktur annehmen. In einer Art Polymerisationsprozeß bilden sich

hochmolekulare Aggregate von PrP^{Sc} . Diese können durch äußere Einflüsse wieder in einzelne Keime getrennt werden. Der entscheidende Unterschied ist, daß bei diesem Modell die PrP^{Sc} -Konformation keine intrinsische Eigenschaft eines PrP -Monomers sein muß, wie es beim Heterodimer-Modell der Fall ist. Dies manifestiert sich darin, daß bisher keine löslichen monomeren Proteinase-resistenten und nichtaggregierten Formen von PrP^{Sc} gefunden werden konnten. Diese biophysikalischen Eigenschaften erwirbt PrP^{Sc} nach dem Modell der kernabhängigen Polymerisation erst im hochmolekularen PrP -Aggregat. Die Vermehrung spezifischer Scrapie-Stämme kann mit diesem Modell wie folgt erklärt werden: Wie bei einem Kristall trägt die kleinste infektiöse Einheit, der Keim, die Information für die Struktur des Ganzen. Somit kann ein PrP^{Sc} -Oligomer durch seine Keimstruktur die Struktur des polymeren PrP -Aggregats (oder die Kinetik für dessen Bildung) festlegen und damit die jeweilige charakteristische Pathologie der einzelnen Stämme verursachen.

Ein detaillierter Vergleich der beiden Modelle aus kinetischer Sicht wurde kürzlich von Manfred Eigen publiziert.^[75] Danach besteht der Hauptunterschied darin, daß das Modell der kernabhängigen Polymerisation keinen katalytischen Mechanismus verlangt. Das Wachstum des „Kristalls“ wird durch die Gibbs-Energie begünstigt, die Umfaltung von PrP^{c} durch die Kristalloberfläche bewirkt. Dagegen liegt Prusiners Heterodimer-Modell ein autokatalytischer Mechanismus zugrunde – allerdings nur dann, wenn die Dissoziation des PrP^{Sc} -Heterodimers nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Bei einer langsamen Dissoziation würde der (Auto-)Katalysator PrP^{Sc} nur unvollständig regeneriert und der katalytische Cyclus bald beendet. Eine Unterscheidungsmöglichkeit bestünde in der Messung der Geschwindigkeit, mit der der PrP^{Sc} -Anteil zunimmt: Ein autokatalytischer Mechanismus hätte eine exponentielle Zunahme zur Folge, die Kristallbildung würde annähernd quadratisch mit der Zeit verlaufen.^[75]

3.4. In-vitro-Konvertierung

Um das Heterodimer-Modell zu belegen, wurde von vielen Arbeitsgruppen intensiv versucht, eine direkte Wechselwirkung von PrP^{c} mit PrP^{c} und/oder PrP^{Sc} in vitro zu zeigen. Der Nachweis einer In-vitro-Umwandlung von PrP^{c} in PrP^{Sc} würde die Protein-only-Hypothese als Ganzes bestätigen. Bislang sind diese oft als Schlüsselexperimente der Prion-Forschung bezeichneten Versuche, die auf dem Mischen von PrP^{c} mit PrP^{Sc} in vitro beruhen, allerdings fehlgeschlagen. Weder konnten $\text{PrP}^{\text{c}}/\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Heterodimere detektiert werden, noch gelang der Nachweis, daß sich PrP^{c} in vitro durch Zugabe von PrP^{Sc} konvertieren läßt.^[76] Mitte 1994 berichteten Kocisko et al. erstmals über die zellfreie Herstellung von Proteinase-resistentem Prion-Protein (Abb. 8).^[77] Sie verwendeten dazu Proteinase-K-sensitives PrP^{c} , das sie mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markierten. Dieses durch Proteinase K vollständig hydrolysierbare ^{35}S -markierte PrP^{c} wurde mit Proteinase-K-resistentem, unmarkiertem PrP^{Sc} inkubiert. Um das PrP^{c} von potentiell entstandenem PrP^{Sc} zu trennen, wurde der Reaktionsansatz mit Proteinase K behandelt. Durch Gelektrophorese und Autoradiographie konnte gezeigt werden, daß sich radioaktives, Proteinase-K-resistentes PrP^{Sc} gebildet hatte – ein Hinweis darauf, daß PrP^{Sc} de novo aus

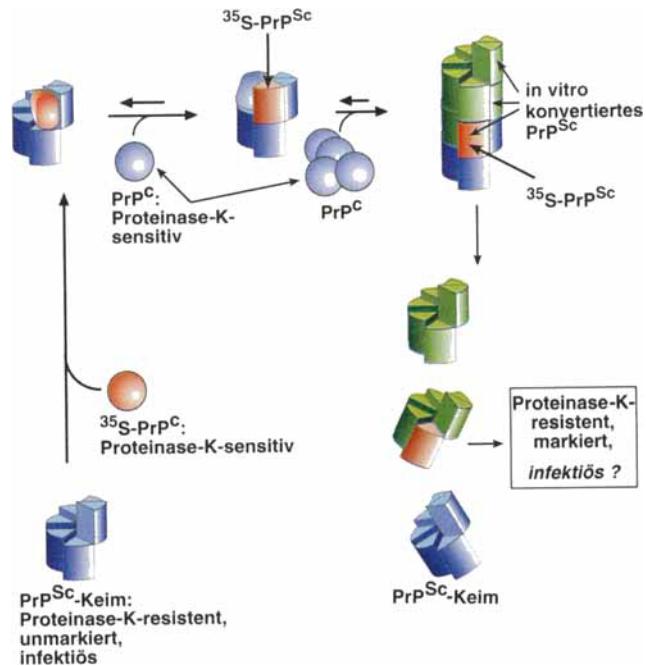


Abb. 8. Zellfreie Herstellung von Proteinase-resistentem Prion-Protein [77, 78]. Radioaktiv markiertes PrP^{c} (rot) wird mit Proteinase-K-resistentem PrP^{Sc} (blau) inkubiert und dabei in das Polymer integriert. Am Ende der Reaktion kann eine markierte, Proteinase-K-resistente Spezies detektiert werden.

dem markierten PrP^{c} entstanden war. Dieses Experiment ist ein zwar notwendiger, aber noch kein hinreichender Beleg für die In-vitro-Konvertierung von PrP^{c} , denn es ist bisher nicht gelungen zu zeigen, daß dieses in vitro hergestellte Proteinase-K-resistente Material auch infektiös ist. Die Proteinase-K-Resistenz korreliert nicht unbedingt mit der Infektiosität von PrP^{Sc} (vgl. Abschnitt 3.1). Trotz des (noch) fehlenden Nachweises der De-novo-Generierung von Infektiosität in vitro hat man nun ein Modell, mit dem sich einige Phänomene der Prion-Vermehrung simulieren und untersuchen lassen. So gelang mit dem zellfreien System inzwischen sogar eine stammspezifische In-vitro-Konvertierung;^[78] man verwendete dazu die Nerz-spezifischen Scrapie-Stämme „hyper“ (HY) und „drowsy“ (DY). Diese TME-Stämme haben sich ursprünglich in Nerzen manifestiert und lassen sich im Hamster mit der für sie jeweils charakteristischen Pathologie vermehren. HY- und DY- PrP^{Sc} werden von Proteinase K an unterschiedlichen N-terminalen Stellen gespalten, so daß charakteristische Verdauungsmuster unterschiedlich langer PrP-Fragmente resultieren, die durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nachgewiesen werden können.^[79] Präpariert man HY- PrP^{Sc} aus Hamsterhirnen und setzt es in der oben beschriebenen Konvertierung im zellfreien System ein, entsteht resistentes Protein, das nach der Behandlung mit Proteinase K ein Verdauungsmuster zeigt, das dem von HY- PrP^{Sc} entspricht. Verwendet man hingegen DY- PrP^{Sc} -Proben, erhält man das charakteristische Muster von DY- PrP^{Sc} .^[78] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß einem einzigen zellulären Prion-Protein im zellfreien Konvertierungssystem wahrscheinlich zwei unterschiedliche Konformationen der Scrapie-Form eines Prion-Proteins aufgezwungen werden können. Dieses Experiment ist somit ein Modell für die Vermehrung unterschiedlicher Scrapie-Stämme in vitro – eine wichtige Ergänzung oder Alternative zum transgenen Tiermodell.

3.5. Weitere Aspekte der stammspezifischen Prion-Vermehrung

Inzwischen sind mit Hilfe eines transgenen Mausmodells Experimente durchgeführt worden,^[80] aus denen sich ähnliche Schlüsse ziehen lassen wie aus den von Bessen et al.^[78] beschriebenen stammspezifischen In-vitro-Konvertierungsversuchen. Die in diesen Experimenten verwendeten, mit dem Kürzel [Tg(MHu2M)] bezeichneten Mäuse^[81, 82] exprimieren ein chimaeres human-murines PrP-Gen. Die Mäuse wurden mit Hirnextrakten von Patienten inkuliert, die an verschiedenen Formen menschlicher TSE-Krankheiten verstorben waren. Die Extrakte enthielten somit PrP^{Sc}-Fragmente von zwei unterschiedlichen menschlichen PrP-Stämmen – dem der sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD) und dem der fatalen familiären Insomnie (FFI; zu den menschlichen TSE-Formen siehe Abschnitt 4.3). Mit Proteinase K behandelte PrP^{Sc}-Stämme dieser Art zeichnen sich durch unterschiedliche Fragmentlängen nach der Deglycosylierung aus: Während das FFI-Bruchstück eine Größe von 19 kD aufweist, liegt die Größe des sCJD-Fragments bei 21 kD, so daß sich beide Fragmente durch denaturierende Polyacrylamidgelektrophorese leicht unterscheiden lassen. Etwa 200 Tage nach der Inkulation konnte eine für den jeweiligen PrP^{Sc}-Stamm spezifische Fragmentbildung in den Maushirnen beobachtet werden: Inkulation mit dem FFI-Stamm führte zur Bildung des 19-kD-Fragments, während das 21-kD-Fragment nur nach Behandeln mit dem sCJD-Stamm erhalten werden konnte. Aus diesen Befunden kann der Schluß gezogen werden, daß die Konformation des jeweiligen PrP^{Sc}-Stammes als Templat für die Bildung von PrP^{Sc} wirkt und somit ausschlaggebend für dessen stammspezifische Charakteristika ist. Diese Experimente deuten darauf hin, daß die Diversität der PrP^{Sc}-Stämme in der Konformation des die Neubildung von PrP^{Sc} auslösenden Stammes zugrundegelegt ist.

Leslie Orgel weist in einer neueren Arbeit auf einen weiteren Aspekt hin, der bei der Prion-Aggregation eine Rolle spielen könnte: die „Sekundärnukleation“.^[83] Dieses Phänomen kann beispielsweise bei der enantiomorphen Kristallisation aus übersättigten NaClO₃-Lösungen beobachtet werden. Erfolgt die Kristallisation unter heftigem Rühren, so werden entweder reine D- oder reine L-Kristalle erhalten, während bei der „ungestörten“ Kristallisation D- und L-Kristalle in etwa gleicher Anzahl resultieren.^[84] Man nimmt an, daß durch das Rühren der primäre Kristallkeim und die neu gebildeten Sekundärkeime fragmentiert werden. Alle entstehenden Kristalle wären dann „Nachkommen“ (oder „Klone“) des Primärkeims und gebildet, bevor ein weiterer Primärkeim entgegengesetzter Chiralität entstanden war. Auf analoge Weise könnten bestimmte Details (Stammspezifitäten) der Pathologie von Prion-Krankheiten durch Sekundärnukleation determiniert sein. Andernfalls – so Orgel – sollte man erwarten, daß ein endogen entstandener oder von außen zugeführter PrP^{Sc}-Keim ein einzelnes lokalisiertes Plaque bildet. Je effektiver eine eventuell stattfindende Sekundärnukleation ist, um so weniger lokalisiert wären die resultierenden Plaques. Somit würde die Zahl der entstehenden Keime die Schwere der Krankheit bestimmen – ähnlich wie die Heftigkeit einer Krebserkrankung stark von der Tendenz zur Metastasierung des Primärtumors abhängt. Eine Sekundärnukleation

wurde im Falle der Prion-Vermehrung noch nicht gezeigt und dürfte auch schwierig nachzuweisen sein.

Wie später genauer diskutiert werden wird, gibt es noch weitere Möglichkeiten, die Stammspezifität der Prion-Vermehrung zu erklären, beispielsweise mit der Existenz einer dritten Komponente – eines stammspezifischen Cofaktors oder Proteins X –,^[82] die direkt oder indirekt an der Vermehrung von PrP^{Sc} beteiligt ist (Abschnitt 5.2).

4. Epidemiologie und Übertragbarkeit

Nach der eingehenden Analyse des Erregers stellt sich nun die Frage nach der Übertragbarkeit von Prion-Krankheiten. Wie kam es zu dem epidemiologischen Ausbrechen von BSE in Großbritannien? Wie steht es mit der Übertragbarkeit von einer Spezies auf eine andere? Von wichtiger gesellschaftlicher, wirtschaftspolitischer und gesundheitlicher Bedeutung ist insbesondere die Frage nach der Gefährdung des Menschen durch BSE.

4.1. Die Scrapie-Kuru-Verbindung: ein historischer Abriß

Spongiforme Encephalopathien sind seit dem 18. Jahrhundert bekannt. Die älteste gesicherte Aufzeichnung beschreibt bestimmte auffällige Verhaltensweisen bei Schafen: Im Frühstadium traten bei den betroffenen Tieren Desorientierung und Juckreiz auf – sie kratzten sich z. B. an Weidezäunen und Bäumen die Körper wund, weshalb im englischen Sprachraum der Name „Scrapie“ (engl. to scrape: kratzen) geprägt wurde. Im deutschsprachigen Raum wird diese Krankheit als „Traberkrankheit“ bezeichnet. Der Name erinnert daran, daß die befallenen Tiere im fortgeschrittenen Krankheitsstadium mehr und mehr die Kontrolle über ihren Körper verlieren, sich unkoordiniert bewegen (traben), mit den Hinterläufen einknicken und schließlich in völliger Lähmung verenden. Ursache und Übertragungswege der Krankheit blieben über Jahrhunderte unerforscht, unter anderem auch weil sich die Scrapie nie zu einem wirtschaftlichen Problem entwickelte. Die Infektionsrate blieb stets sehr gering – bis zum heutigen Tage konnte man kein epidemiologisches Ausbrechen der Krankheit registrieren; in Deutschland ist sie heute fast verschwunden, in Großbritannien treten noch vereinzelt, aber regelmäßig, Fälle auf.

Das wissenschaftliche Interesse an dieser Krankheit erwachte erst in diesem Jahrhundert, als William Hadlow über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Scrapie und der menschlichen Kuru-Krankheit spekulierte.^[85] Zuvor war schon, unabhängig von der Scrapie, eine Reihe außergewöhnlich langsamer degenerativer Erkrankungen des Zentralnervensystems des Menschen beschrieben worden, unter anderem die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom sowie Kuru. Letztere Erkrankung trat in epidemiologischem Ausmaß bei den Fore, einem Volksstamm in Papua-Neuguinea, auf und wurde vermutlich durch religiöskannibalistische Riten übertragen. D. Carleton Gajdusek und Mitarbeitern gelang die experimentelle Übertragung dieser Krankheit auf Schimpansen durch die Injektion von Hirnmaterial aus an Kuru verstorbenen Menschen.^[86] Auf die gleiche Weise ließ sich auch CJD auf Schimpansen übertragen. Allen

Formen dieser Krankheit waren die ungewöhnlich lange Inkubationszeit und das pathologische Muster der mit Spongiosis einhergehenden Neurodegeneration gemeinsam. Wichtige Erkenntnisse erhielt man aus Experimenten von J. Cuillé und P. L. Chelle, die in den dreißiger Jahren zeigen konnten, daß sich die Scrapie auf gesunde Schafe und Ziegen übertragen läßt.^[87] Auch Hamster und Mäuse sind für diese Krankheit anfällig; beide Arten werden deshalb heute noch in größerem Maßstab im Tierversuch zur Erforschung der Prion-Krankheiten eingesetzt. Wie wir später diskutieren werden (Abschnitt 5.1), gelingt die Übertragung von TSEs von einer Spezies auf eine andere dennoch nicht völlig ungehindert.

4.2. BSE – vom Knochenmehl zur Epidemie

Wegen ihrer Seltenheit waren TSEs zunächst ein Gebiet von akademischem Interesse. Das änderte sich schlagartig, als 1986 der erste Fall der bovinen spongiformen Encephalopathie (BSE) in Großbritannien histologisch bestätigt wurde.^[88] Es konnte gezeigt werden, daß Fibrillen aus den Gehirnen von an BSE erkrankten Rindern ein Scrapie-assoziiertes Protein enthielten.^[89] Diesem ersten Befund folgten zahlreiche weitere; die BSE-Epidemie in Großbritannien hatte zwischen 1992 und 1993 mit bis zu 3500 Neuerkrankungen im Monat ihren Höhepunkt und ist inzwischen auf etwa 500 neue Fälle pro Monat abgeklungen (Abb. 9). Bis heute (Stand: 25. April 1997; Quelle: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Großbritannien) sind in Großbritannien 167321 BSE-Fälle bestätigt worden. Der Ausgangspunkt der Rinderseuche war die Anfang der achtziger Jahre wegen wirtschaftlicher Sparmaßnahmen veränderte Produktion von Knochen- und Fleischmehl. Dieses bei der Viehhaltung eingesetzte Futtermittel wird unter anderem aus Schafskadavern gewonnen. Die der Sterilisation dienende Temperaturbehandlung wurde von britischen Betrieben Anfang der achtziger

Jahre durch Absenken der Temperatur von 130 auf 110 °C modifiziert. Darüber hinaus wurde das Extrahieren mit organischen Lösungsmitteln abgeschafft.^[91] Ob das gehäufte Auftreten von BSE auf Scrapie-kontaminiertes Tiermehl zurückzuführen ist, also durch eine Übertragung vom Schaf auf das Rind ausgelöst wurde, oder ob das Tiermehl mit dem BSE-Erreger aus spontan erkrankten Rindern verunreinigt war, kann heute nicht mehr mit Sicherheit festgestellt werden. Die Verbreitung des infektiösen Agens über das Futter ist aber als Auslöser für die BSE-Epidemie eindeutig bestätigt worden.^[91, 92] Dafür spricht auch die relative Häufung von BSE-Fällen in der Schweiz, die bis zum Fütterungsverbot vom 18. Juli 1988 Hauptimporteur von britischem Tiermehl war. Weltweit wurde BSE bisher in 12 Staaten bestätigt (Tabelle 2). Neben der Infektion durch das Futter sind aber nach neueren Hinweisen auch andere Übertragungsformen denkbar, insbesondere die Übertragung vom Muttertier auf das Kalb.^[93]

Tabelle 2. Auftreten von BSE weltweit (Stand: März 1996)

Land	Anzahl der BSE-Fälle	Land	Anzahl der BSE-Fälle
Großbritannien	167321 [a]	Deutschland	5 [b]
Nordirland	1656	Italien	2
Schweiz	189	Oman	2
Irland	115	Falklandinseln	1
Portugal	29	Dänemark	1
Frankreich	13	Kanada	1

[a] Stand: April 1997. [b] Stand: Januar 1997.

Eine aktuelle Studie, die die BSE-Epidemie in Großbritannien in ihrer Gesamtheit, d. h. von den ersten Fällen bis zu einer möglichen epidemiologischen Entwicklung in der Zukunft, untersucht,^[90] kommt zu dem Schluß, daß die Zahl der Neuinfektionen durch kontaminiertes Futter bereits Ende 1994 nahezu

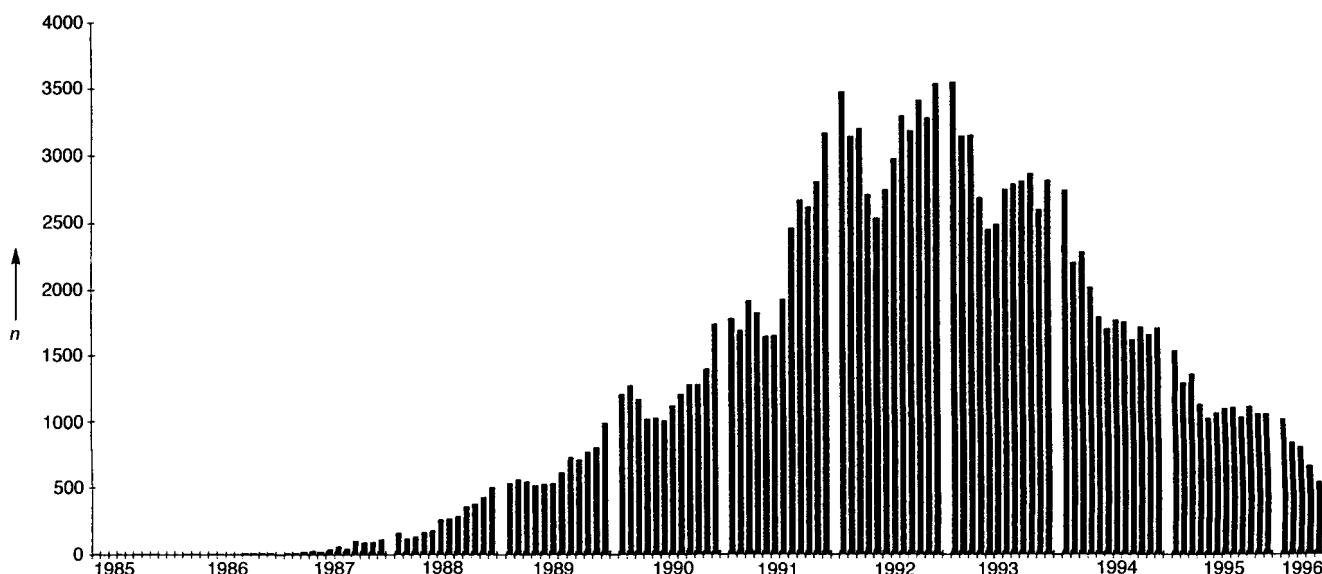


Abb. 9. Bestätigte BSE-Fälle n pro Monat und Jahr in Großbritannien. Das Abklingen der Kurve ist unter anderem auf ein Verbot der Verfütterung von Knochen- und Tiermehl an Rinder durch die britische Regierung in den Jahren 1988 und 1989 zurückzuführen. Nach Ablauf der mittleren Inkubationszeit von fünf Jahren hatten diese Maßnahmen wohl zur Verminderung der BSE-Inzidenz geführt.

null war und alle neuen Fälle auf horizontale Übertragung (maternale Transmission) zurückzuführen sind. Die absoluten Zahlen für Neuinfektionen über diesen Weg sind nach dieser Untersuchung so gering, daß die Epidemie bis etwa zum Jahr 2001 auch ohne zusätzliche Schlachtpläne von selbst verschwinden werde. Die britische Regierung nutzte diese Studie im September 1996 als Argument, um das von ihr zur Eindämmung von BSE beschlossene Rinderschlachtpläne zunächst auszusetzen. Dabei wird allerdings ein wichtiges weiteres Ergebnis der Studie, das der Inkubationszeiten, vernachlässigt. Von der Infektion bis zum Ausbruch der ersten Symptome vergehen etwa fünf Jahre. Da aber die meisten Rinder im Alter von etwa zwei Jahren geschlachtet werden, also lange bevor ein Tier als infiziert erkannt werden kann, besteht nach wie vor die Möglichkeit, daß infizierte und potentiell infizierte Tiere in die menschliche Nahrungskette gelangen. Wirkliche Sicherheit würde in diesem Fall also nur eine zuverlässige Diagnose der Infektion bieten, mit der die Krankheit lange vor dem Auftreten klinischer Symptome nachgewiesen werden könnte, beispielsweise durch direkte Detektion der PrP^{Sc}-Form des Rinder-Prion-Proteins (vgl. Abschnitt 4.4).

4.3. Spongiforme Encephalopathien beim Menschen

Anfang der zwanziger Jahre beschrieben der Kieler Neurologe Hans-Gerhard Creutzfeldt^[94] und sein Hamburger Kollege Alfons Jakob^[95] unabhängig voneinander eine „eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde“, die nach einem unaufhaltsamen Zerfall des Hirngewebes zum Tod führt und heute als Creutzfeldt-Jakob-Krankheit bekannt ist. Im Jahr 1936 beobachteten die Wiener Neurologen Josef Gerstmann und Ernst Sträussler sowie der Neuropathologe I. Scheinker ein sehr ähnliches, wenn auch etwas selteneres Syndrom des Menschen.^[96] Klinisch standen dabei Koordinationsstörungen der betroffenen Patienten im Vordergrund. Im Unterschied zur CJD, bei der zunächst ein Verlust des Erinnerungsvermögens und ein progressiver Rückgang des Intellekts stattfinden, tritt Demenz beim Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom erst in der späteren klinischen Phase auf. GSS manifestiert sich in Form von Ataxie und anderen Degenerationserscheinungen im Cerebellum (Kleinhirn). Histopathologisch ähneln sich die beiden Krankheitsformen CJD und GSS: Man stellt Degenerationserscheinungen mit Vakuolisierung (Vakuolen sind Hohlräume in Zellen, die mit flüssigem Inhalt, z. B. Proteinen oder Fett, gefüllt sind) sowie Amyloidablagerungen im Gehirn fest. Solche Ablagerungen sind auch bei der Alzheimer-Krankheit bekannt, die aber nicht zu den Prion-Krankheiten zählt. Eine weitere erbliche Form der menschlichen Prion-Krankheiten ist die fatale familiäre Insomnie, die von einer amerikanischen Gruppe um Pierluigi Gambetti und einer italienischen um Elio Lugaresi und Rossella Medori entdeckt wurde.^[97] Sie unterscheidet sich von den anderen Formen dahingehend, daß die Patienten zunächst unter Schlafstörungen leiden und sich daran die Demenz anschließt.^[98] Eine weitere Form der menschlichen Prion-Krankheiten ist die bereits beschriebene Kuru-Krankheit (Abschnitt 4.1), die einzige der vier TSE-Formen beim Menschen, die ausschließlich durch Infektion übertragen wurde.

4.3.1. Sporadische und infektiöse Formen

Prion-Krankheiten haben die einzigartige Eigenschaft, daß sie sowohl infektiös (exogener Ursprung) als auch sporadisch oder genetisch (endogener Ursprung) bedingt sein können. Die überwiegende Zahl der TSE-Fälle beim Menschen tritt sporadisch auf oder wird durch Übertragung verursacht (z. B. Kuru); es gibt aber auch familiäre Fälle, bei denen genetische Ursachen für den Ausbruch der Krankheit von Bedeutung sind. CJD tritt beim Menschen zu 85% sporadisch auf (sCJD), d. h. eine Infektionsquelle konnte in diesen Patienten nicht gefunden werden. Einige wenige CJD-Fälle können auf eine versehentliche Infektion mit dem CJD-Erreger während einer medizinischen Behandlung zurückgeführt werden, z. B. bei Kindern, die mit Wachstumshormon behandelt worden waren, das aus den Hirnanhangdrüsen Verstorbener gewonnen worden war^[99, 100] (heute wird dieses Hormon gentechnisch hergestellt). Dem Risiko der iatrogenen Übertragung waren auch Patienten ausgesetzt, die sich einem neurochirurgischen Eingriff unterziehen mußten; aus Unwissenheit über die außerordentliche Resistenz des Prion-Erregers gegenüber herkömmlichen Sterilisationstechniken (siehe Abschnitt 3.1) wurde CJD in einigen Fällen über kontaminierte neurochirurgische Geräte übertragen. Neben iatrogenen und sporadischen Erkrankungen treten mehr als 10% familiäre Fälle wie GSS und FFI mit einer genetischen Disposition auf.

4.3.2. Mutationen im *Prn-p*-Genlokus

Auch bestimmte CJD-Fälle können erblich bedingt sein. Bereits 1930 beschrieb der Arzt F. Meggendorfer erbliche Fälle von CJD bei einer norddeutschen Familie. Die DNA in einer Gehirngewebeprobe, die in Celloidin eingebettet worden war, wurde Jahrzehnte später mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert und sequenziert. Es zeigte sich, daß im Codon 178 des *Prn-p*-Gens eine GAC → AAC-Mutation auftrat, die dem Austausch Asp178 → Asn entspricht^[101] (Abb. 10).

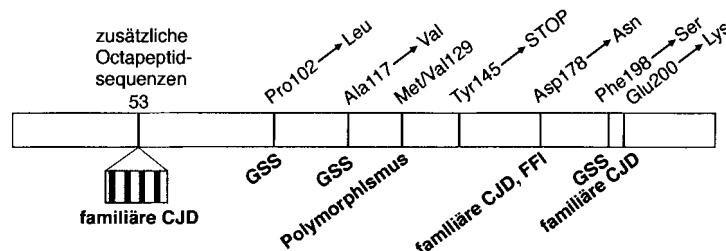


Abb. 10. Mutationen und Polymorphismen im humanen *Prn-p*-Gen im Zusammenhang mit familiären Formen von spongiformen Encephalopathien. Der Polymorphismus an Position 129 scheint die Suszeptibilität gegenüber vCJD zu beeinflussen, da alle bisher untersuchten Fälle von vCJD homozygot für Met129 sind.

Weitere mit genetischen Dispositionen assoziierte Mutationen sind Glu 200 → Lys, Pro 102 → Leu, Ala 117 → Val und Phe 198 → Ser sowie zusätzliche Octapeptidsequenzen innerhalb des menschlichen *Prn-p*-Gens.^[22] Besonders interessant ist die Position 129, an der Valin- und Methioninreste auftreten können. Bei Patienten, die an CJD erkrankten, nachdem sie mit einem Wachstumshormon aus humanen Hirnanhangdrüsen behandelt worden waren, fanden John Collinge und Mitarbeiter

eine signifikante Häufung von Val¹²⁹-Homozygotie.^[102] Mehr als 50 % der kaukasischen Bevölkerung sind an dieser Position heterozygot (Met/Val). Möglicherweise ist eine Dimerisierung des Prion-Proteins, die in homozygoten Patienten leichter stattfinden könnte als in heterozygoten, für die Pathogenese von CJD wichtig. Unterschiedliche Phänotypen der verschiedenen TSE-Formen beim Menschen, wie man sie etwa bei CJD im Vergleich zu FFI beobachten kann, scheinen mit unterschiedlichen Genotypen zu korrelieren. In einer Studie, in der familiäre TSE-Fälle (mit dem Austausch Asp178 → Asn) untersucht wurden, konnte gezeigt werden, daß der Genotyp an Position 129 die Art der Pathologie bestimmt. Patienten mit Met129/Asn178 zeigten einen FFI-Phänotyp, während bei den CJD-Patienten Val129/Asn178 auftrat.^[103, 104] Es wurde vorgeschlagen, daß die Kombination aus der Mutation im Codon 178 und dem Polymorphismus im Codon 129 den Phänotyp der Krankheit bestimmt, indem zwei unterschiedliche Konformationen des Prion-Proteins entstehen.^[105, 106] Bei den erblichen Prion-Krankheiten würden die mutierten Formen spontan Konformationen einnehmen, die durch die Mutation bestimmt werden. Eine direkte Wechselwirkung zwischen Methionin oder Valin an Position 129 und Asparagin an Position 178 könnte zu zwei abnormalen Isoformen führen, die sich in ihrer Konformation und ihren pathogenen Eigenschaften unterscheiden. In diesen Mutanten könnte die Aktivierungsenergie der Konformationsumwandlung erniedrigt sein. Der Polymorphismus an Position 129 scheint auch bei einer neuen CJD-Variante von entscheidender Bedeutung zu sein, wie unten diskutiert werden wird.

Für das Auftreten von GSS sehr wichtig scheint auch die Mutation Pro102 → Leu zu sein, die zugleich als erste im Zusammenhang mit erblichen Prion-Krankheiten identifiziert wurde.^[107, 108] Von elf japanischen GSS-Patienten wiesen alle an Position 102 des *Prn-p*-Gens Leucin auf,^[109] die gleiche Mutation wurde auch bei GSS-Fällen in einer jüdischen Familie gefunden.^[110] Interessanterweise ist das Prolin an Position 102 innerhalb vieler Spezies konserviert, was auf eine wichtige Rolle für die biologische Funktion des Proteins hinweisen könnte (Abb. 10). Eine außergewöhnliche Mutation in *Prn-p* wurde 1993 von der japanischen Gruppe um Tateishi publiziert. Sie fanden in einer Patientin Codon 145 (normalerweise Tyrosin codierend) durch ein Stop-Codon ersetzt.^[111] In den amyloiden Plaques der Patientin, bei der ursprünglich die Alzheimer-Krankheit diagnostiziert worden war, konnten dementsprechend C-terminal verkürzte PrP-Fragmente analysiert werden. Diesen Fragmenten fehlten somit (vermeintlich) wichtige Elemente wie die Glycosylierungsstellen, die Disulfidbrücke und der GPI-Anker (siehe Abb. 3). Neueren Untersuchungen zufolge scheint aber bei dieser Form der familiären TSE auch das normale Allel am pathologischen Prozeß beteiligt zu sein, da in den Plaques auch der C-Terminus von PrP über spezifische Antikörper detektiert werden kann.^[112]

Über genetische Dispositionen bei anderen Spezies ist bisher wenig publiziert worden. Beispielsweise ist bekannt, daß beim Schaf die Polymorphismen an den Positionen 136 und 171 die Suszeptibilität für Scrapie beeinflussen (analog zum Polymorphismus an Position 129 im humanen Genlokus); Schafe mit einer Val136/Gln171-Homozygotie haben eine deutlich verminderte Resistenz gegenüber einer Scrapie-Infektion als Tiere mit homozygotem Ala136/Arg171-Genotyp.^[113] Diese genetisch

bedingten Prädispositionen sind alle vererbar. Interessanterweise ist es hinsichtlich der Infektiosität der aus erkrankten Spezies isolierten Prionen allerdings unerheblich, auf welche Weise eine Prion-Krankheit ausgelöst wurde: Das Prion-Protein aus einem erkrankten Gehirn ist in jedem Fall infektiös.

4.3.3. vCJD – die Verbindung zwischen BSE und CJD?

Anfang 1996 berichtete eine englische Forschergruppe von einer bis dahin nicht beschriebenen Form der CJD.^[114] Die von der neuen Variante („vCJD“) betroffenen Patienten (bisher 15; Stand: April 1997) zeigen zwar die bekannten pathologischen Merkmale von CJD, diese sind jedoch auffällig modifiziert: 1) Die Patienten sind mit einem Durchschnittsalter von ca. 30 Jahren relativ jung; 2) die durchschnittliche Zeit vom Auftreten der ersten Symptome bis zum Tod beträgt etwa 15 Monate – mehr als doppelt so viel wie der entsprechende Zeitraum bei normalen CJD-Patienten; 3) die amyloiden Ablagerungen oder Plaques weisen zusammen mit den spongiosen Veränderungen eine charakteristische Morphologie auf, die bisher bei keinem anderen CJD-Fall beobachtet werden konnte (Abb. 11). Diese

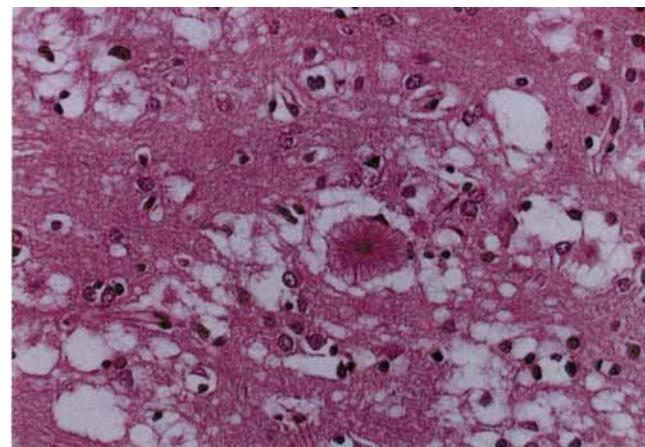


Abb. 11. Dünnschnitt vom Gehirn eines an vCJD verstorbenen Patienten. Eine besonders auffällige pathologische Veränderung bei vCJD ist die Bildung „florider“ Plaques, die konzentrisch von einer Zone spongioser Veränderung umgeben sind. Das Bild wurde freundlicherweise von J. Ironside, University of Edinburgh, zur Verfügung gestellt.

„floriden“ (engl. florid: blütentümlich) Plaques ähneln denen von Kuru-Patienten und scheinen mit denen BSE-infizierter Makaken-Affen identisch zu sein.^[115] Diese und andere charakteristische Merkmale (z. B. keine EEG-Anomalien bei vCJD-Patienten, Homozygotie für Met129) sprechen für die Manifestation eines neuen TSE-Stammes im Menschen – möglicherweise in ursächlichem Zusammenhang mit der BSE-Epidemie in Großbritannien. Fast alle vCJD-Patienten stammten nämlich aus Großbritannien, lediglich aus Frankreich wurde ebenfalls von einem Patienten berichtet.^[116] Interessanterweise hatte gerade Frankreich in dem betreffenden Zeitraum einen sehr hohen Importanteil an britischem Rindfleisch, so daß sicherlich ein entsprechend hoher Anteil potentiell infizierten Gewebes von Großbritannien nach Frankreich gelangt war. Neueste Studien erhärten den Verdacht, daß BSE auf den Menschen übertragen wurde. Collinge und Mitarbeiter untersuchten mittels Elektro-

phorese die Mobilitäten von PrP^{res} aus Präparationen unterschiedlicher TSE-Fälle. Dabei interessierten sie insbesondere die Proteinanteile mit unterschiedlichem Glycosylierungsgrad („glycoform patterns“, doppelte, einfache, keine Glycosylierung; vgl. Abb. 3), die sie in vier Gruppen einteilten.^[117] Danach repräsentieren die Typen 1 und 2 zwei unterschiedliche Arten von sCJD, Typ 3 tritt bei iatrogenen Fällen von CJD auf, während bei allen vCJD-Fällen das Typ-4-Muster gefunden wurde, das vorher noch bei keinem anderen CJD-Fall beobachtet worden war. An BSE erkrankte Rinder sowie durch BSE-Material infizierte Makaken-Affen zeigen ebenfalls Typ 4 des Verdauungsmusters – ein weiterer Hinweis auf den kausalen Zusammenhang von BSE und vCJD. Diese experimentell relativ einfache Klassifizierung von CJD-Phänotypen in vier Gruppen ist aber keineswegs unumstritten. Parchi et al. publizierten kürzlich, daß sie nach der von Collinge et al. beschriebenen Methode lediglich zwei unterschiedliche PrP^{res} -Klassen beobachteten.^[118] Somerville et al. konnten darüber hinaus zeigen, daß das von Collinge beschriebene „glycoform pattern“ eines TSE-Stammes im Versuchstier nicht unbedingt stabil ist. Die Anteile unterschiedlich glycosylierter PrP^{res} verschieben sich beim Passagieren (Übertragen) des Stammes von Versuchstier zu Versuchstier.^[119]

Auch bei Betrachtung der klinischen Symptome stellt sich die Frage nach der Einzigartigkeit von vCJD. Man kann nicht mit Sicherheit ausschließen, daß die markanten pathologischen Merkmale von vCJD schon vor Ausbruch der BSE-Epidemie aufgetreten sind. Wegen der Seltenheit der Krankheit ist davon auszugehen, daß vor der Sensibilisierung durch BSE nicht alle Fälle von CJD eindeutig diagnostiziert wurden (vgl. Abschnitt 4.4). Es ist durchaus denkbar, daß schon früher Erkrankungen an vCJD aufgetreten sind, die aber nicht als solche erkannt wurden, da vorwiegend jüngere Patienten betroffen sind. Es ist auch zweifelhaft, ob das Auftreten von floriden Plaques als eindeutiges morphologisches Unterscheidungskriterium zwischen vCJD und anderen CJD-Formen dienen kann. Kürzlich wurde von einem nichtfamiliären CJD-Fall berichtet, der nach den oben genannten Kriterien nicht eindeutig als vCJD eingestuft werden konnte; trotzdem fanden sich im Gehirn der verstorbenen Patientin floride Plaques. Da die Patientin vor mehr als zehn Jahren neurochirurgisch unter Verwendung von Dura mater (harte Hirnhaut) behandelt worden war, ist eine iatrogene Übertragung nicht auszuschließen.^[120]

4.4. Diagnostische Verfahren

Eine gesicherte Diagnose von BSE am lebenden oder am symptomfreien Rind ist wirtschaftlich und gesundheitspolitisch von höchstem Interesse. Hinsichtlich der potentiellen Gefährdung des Menschen durch vCJD hat natürlich auch die Diagnose am Menschen besondere Bedeutung. Ziel ist die Entwicklung eines Tests, mit dem man – möglichst aus dem Blut oder dem Urin – innerhalb kurzer Zeit den Infektiositätsstatus nachweisen kann.

4.4.1. Bisherige diagnostische Methoden

Die frühe Diagnose von TSE beschränkt sich auf das Auftreten der (nicht eindeutigen) klinischen Symptome, auf EEG-

Anomalien, abbildende Kernspinresonanzverfahren oder die invasive Hirnbiopsie; bei letzterer entnimmt man dem Gehirn eine Gewebeprobe, die nach Inkubation mit Proteinase K mit Hilfe von Antikörpern auf die Anwesenheit von (Proteinase-resistentem) PrP getestet wird. Die Hirnbiopsie ist im positiven Fall (d. h. bei Vorliegen von PrP^{sc}) relativ zuverlässig. Dagegen ist die Negativ-Diagnose am lebenden Organismus bis heute sehr schwierig. Eine sichere Diagnose ist erst post mortem anhand der oben dargestellten pathologischen Veränderungen und der immunhistologischen Befunde im Hirngewebe möglich. Die Grundlage eines sensitiven Tests wäre – wie bei vielen diagnostischen Systemen, z. B. dem HIV-Nachweis – ein Antikörper, der PrP^{sc} spezifisch erkennen kann. Tatsächlich ist es aber bis heute nicht gelungen, einen solchen für die pathogene Isoform spezifischen Antikörper zu entwickeln.^[121, 122] Die zur Verfügung stehenden Anti- PrP -Antikörper können nicht zwischen der zellulären Form des gesunden und der Scrapie-Form des erkrankten Organismus unterscheiden. Beim immunhistochemischen Nachweis von PrP aus Gehirnschnitten nutzt man die unterschiedliche Proteinase-K-Sensitivität der beiden PrP -Formen. Proteine, die nach einer Proteinase-K-Behandlung mit einem PrP -Antikörper detektierbar sind, spiegeln den Gehalt der Probe an PrP^{sc} wider. Allerdings ist dieser Test nicht sehr empfindlich, außerdem korreliert die Proteinase-K-Sensitivität nicht immer mit der Infektiosität einer Probe (Abschnitt 3.1).

4.4.2. Neue diagnostische Ansätze

In den letzten Monaten wurden einige experimentelle Ansätze vorgestellt, die Grundlage eines diagnostischen Testsystems sein könnten. Zwei dieser Systeme werden im folgenden vorgestellt. Eine holländische Gruppe konnte zeigen, daß der Nachweis von Scrapie-assoziiertem PrP^{sc} in den Tonsillen (Mandeln) von Schafen schon lange vor dem Auftreten der ersten klinischen Symptome gelingt. Bei der untersuchten Gruppe von sechs mit Scrapie infizierten Schafen konnte im Alter von zehn Monaten, ungefähr ein Jahr vor der klinischen Manifestation der Krankheit, PrP^{sc} detektiert werden.^[123] Ob sich diese Ergebnisse auf andere Spezies übertragen lassen, ist fraglich. So tritt beim Rind im Gegensatz zum Schaf keine Infektiosität im peripheren Gewebe auf, d. h. der Nachweis von PrP^{sc} durch Biopsie von Tonsillen wäre nicht möglich. Dagegen konnte beim Menschen – bisher allerdings nur in einem vCJD-Fall – PrP^{sc} in den Tonsillen post mortem nachgewiesen werden.^[124]

Eine andere Forschergruppe nutzt als diagnostische Grundlage anstelle von PrP^{sc} einen Proteinmarker, der in der Cerebrospinalflüssigkeit von CJD-Patienten enthalten ist: 1986 entdeckten M. G. Harrington et al. durch zweidimensionale Gelelektrophorese, daß in CJD-Patienten zwei Proteine (als p130 und p131 bezeichnet) vorkommen, die als diagnostische Marker dienen könnten.^[125] Diese Proteine konnten als Abbauprodukte der sogenannten 14-3-3-Proteine identifiziert und die entsprechenden Antikörper erfolgreich in einem Immunoassay zur Diagnose von CJD eingesetzt werden.^[126] Den Patienten wird durch Punktieren des Rückenmarks Cerebrospinalflüssigkeit entnommen und diese mit SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot auf Anwesenheit der 14-3-3-Proteine getestet. Der dazu benötigte Antikörper ist käuflich und der Test selbst in jedem biochemischen Labor innerhalb weniger Stunden durch-

führbar. Dennoch gibt es einige Nachteile: Das Auftreten der 14-3-3-Proteine ist ein Epiphänomen, d. h. neben CJD bewirken auch andere Krankheiten, z. B. die Encephalopathie durch Herpes simplex, ein erhöhtes Vorkommen in der Cerebrospinalflüssigkeit. Entsprechend betrug die Spezifität bei der untersuchten Gruppe von 71 Patienten nur 88 %. Auch die Ergebnisse der Anwendung des Tests beim Rind sind wenig aussagekräftig: Bisher wurden nur wenige Tiere untersucht, die zudem nicht mit BSE, sondern ausnahmslos mit TME infiziert waren. Hierbei zeichnete sich eine bessere Spezifität bei gleichzeitig schlechter Sensitivität ab – nur sechs von neun erkrankten Rindern wurden richtig diagnostiziert. Ferner scheint der Test nach bisherigen Untersuchungen erst in einem relativ weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, vermutlich nicht vor dem Auftreten der ersten klinischen Symptome, zu greifen. Ein effektives Diagnosesystem sollte aber möglichst bald nach der Infektion ansprechen, damit z. B. das Auftreten einer Epidemie durch infizierte Rinder unterbunden werden kann.

5. Transgene Modelle

In vielen Bereichen der Biochemie haben sich transgene Tiermodelle zum Studium molekularbiologischer und pathophysiologischer Zusammenhänge durchgesetzt. Auch bei Untersuchungen von Prion-Krankheiten haben transgene Mauslinien zu entscheidenden Durchbrüchen und Erkenntnissen verholfen. Eines der ersten Tiermodelle für Prion-Krankheiten wurde 1990 von Prusiner et al. vorgestellt.^[127] Dabei wurde eine Mauslinie erzeugt, deren *Prn-p*-Gen eine der humanen GSS-Punktmutation entsprechende Mutation (Pro 102 → Leu; vgl. Abb. 10) aufwies. Dieser veränderte Genotyp bewirkte, daß die Maus spontan die drei klassischen Kennzeichen der übertragbaren Encephalopathien – neurologische Fehlfunktionen, spongiforme Veränderungen und astrozytische Gliose – im Gehirn entwickelte. Damit gelang es erstmals, eine genetisch bedingte Prion-Krankheit in der Maus zu erzeugen. Diese induzierte Neurodegeneration ist von einer experimentellen murinen Scrapie kaum zu unterscheiden; eine Abweichung zeigt sich allerdings bei den Proben, die aus Gehirnen dieser kranken transgenen Mäuse präpariert wurden: Sie sind – wenn überhaupt – nur schwach infektiös.^[128] Außerdem tritt die spontane Neurodegeneration in der transgenen Maus nur dann auf, wenn das mutierte Protein überexprimiert wird, nicht aber bei normalem Expressionsniveau. Möglicherweise sind die pathologischen Erscheinungen auf die Überexpression und nicht auf die Mutation zurückzuführen. Dennoch war die Entwicklung der transgenen „GSS-Maus“ nicht nur eine wichtige Untermauerung der Protein-only-Hypothese, sie eröffnete zugleich die bis heute unverzichtbare Möglichkeit, experimentelle Studien zu TSEs anderer Spezies auf die Maus zu übertragen. So lassen sich mit transgenen Mauslinien beispielsweise Spezies-Barrieren untersuchen.

5.1. Untersuchungen zur Spezies-Barriere

Wenn eine Übertragung spongiformer Encephalopathien von einer Spezies auf eine andere überhaupt erfolgt, dann ist sie sehr ineffizient und geht mit stark verlängerten Inkubationszeiten

einher. Inokuliert man z. B. eine Maus mit einer infektiösen Probe aus einem Hamster, so bleibt die Maus länger als 500 Tage am Leben, während eine infektiöse Maus-Präparation im Mittel schon nach 140 Tagen tödlich wirkt (Abb. 12 a, b). Versucht man umgekehrt, Hamster mit infektiösen Maus-Präparationen zu infizieren, überleben die Hamster mehr als 360 Tage, dagegen beträgt die mittlere Überlebenszeit bei der Verwendung von Hamster-Prionen 75 Tage (Abb. 12 c, d). Mäuse lassen sich

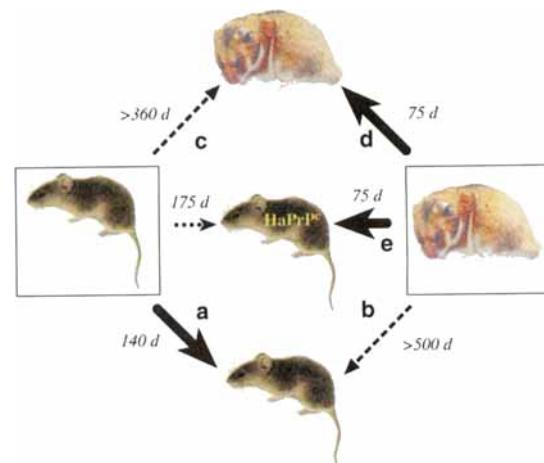


Abb. 12. Spezies-Barriere und deren Überwindung mit dem transgenen Tiermodell. a) Mäuse, die man mit Maus-Prionen inokuliert, sterben durchschnittlich nach 140 Tagen; b) die Inokulation mit Hamster-Prionen überstehen die meisten Mäuse mehr als 500 Tage unbeschadet. Diese Spezies-Barriere kann man auch bei der Verwendung von Hamstern als Versuchstiere beobachten: c) Mit Maus-Prionen infizierte Hamster überleben im Mittel länger als 360 Tage, während d) bei Verwendung von Hamster-Prionen durchschnittlich schon nach 75 Tagen der Tod eintritt. e) Die Spezies-Barriere läßt sich überwinden, wenn man eine transgene Maus, die Hamster-PrP^c exprimiert, mit Hamster-Prionen inokuliert. (Abbildung modifiziert nach Lit. [150], basierend auf Daten aus Lit. [130, 131].)

demnach nur schlecht oder gar nicht mit Hamster-Prionen infizieren und umgekehrt. Diese Spezies-Barriere scheint auf den unterschiedlichen Primärstrukturen der Prion-Proteine der jeweiligen Spezies^[129] zu beruhen: Beispielsweise unterscheiden sich die reifen Formen von Hamster- und Maus-PrP in zwölf Aminosäuren (Abb. 13). Im Sinne der Protein-only-Hypothese bedeutet dies, daß Hamster-PrP^c durch Maus-PrP^{sC} wesentlich weniger effizient in PrP^{sC} umgewandelt wird als Maus-PrP^c und umgekehrt. Was passiert aber, wenn man eine transgene Maus, die Hamster-PrP^c exprimiert, mit Hamster-PrP^{sC} inokuliert? Tatsächlich kommt es zur Infektion mit einer Inkubationsdauer von nur 75 Tagen (siehe Abb. 12 e),^[130, 131] die transgene Hamster-PrP-Maus verhält sich bezüglich der Scrapie-Suszeptibilität folglich wie ein Hamster selbst.

5.2. Der Cofaktor zur Prion-Vermehrung: Chaperoning the Prion?

Die transgenen Mäuse sind die zur Zeit wohl effektivste experimentelle Möglichkeit, um Spezies-Barrieren bei Prion-Krankheiten zu analysieren, und dabei insbesondere Übertragungswege auf den Menschen. Die Inokulation von Mäusen mit CJD-Material führt infolge der Spezies-Barriere nach mehr als 500 Tagen und nur bei 5–10 % der Tiere zur Infektion^[81]

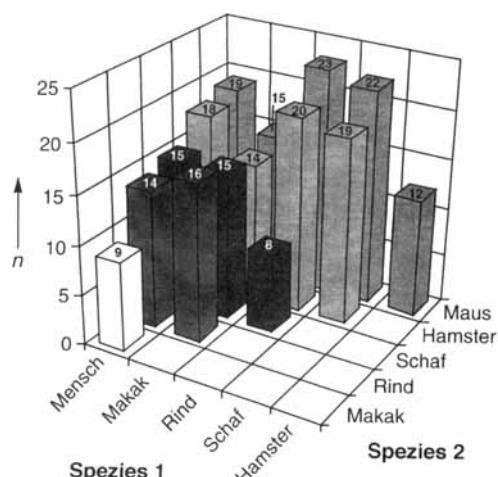


Abb. 13. Darstellung der Abweichungen in der Primärsequenz reifer PrP-Former von ausgewählten Spezies. Die Säulenhöhe gibt jeweils die Zahl n der Abweichungen (Mutationen) zwischen den betrachteten Spezies an. Je niedriger eine Säule ist um so ähnlicher sind sich die PrP-Aminosäuresequenzen. Ob die Zahl der Abweichungen zwischen zwei Spezies mit der Höhe der Spezies-Barriere korreliert oder ob nur bestimmte Mutationen die Spezies-Barriere beeinflussen, ist noch ungeklärt. Die Säulen sind der Übersichtlichkeit halber in unterschiedlichen Grautönen wie dargestellt. (Abbildung basierend auf Daten aus Lit.[129].)

(Abb. 14 A). Unerwarteterweise verändert sich die Scrapie-Suszeptibilität nicht, wenn man transgene Human-PrP-Mäuse verwendet (Abb. 14 B). Erst die Einführung eines aus muriner und humaner Sequenz konstruierten chimären PrP (Aminosäuren 96–167 vom Mensch, N- und C-Terminus von der Maus) macht die transgene Maus für humanes CJD-Material empfänglich^[81] (Abb. 14 C). Prusiner et al. folgerten aus dieser Beobachtung, daß noch weitere, artspezifische Faktoren an der Prion-Vermehrung beteiligt sein müssen. Diese Annahme wurde durch folgendes Experiment gestützt: Transgene Human-PrP-Mäuse können durch Ausschalten von Maus-PrP gegenüber CJD sensitiv werden^[82] (Abb. 14 D). Somit sind Mäuse, die neben ihrem Maus-PrP auch humanes PrP exprimieren, immer noch vor Infektionen mit humanem CJD-Material geschützt, während Mäuse, die nur humanes PrP exprimieren, mit CJD-Proben infiziert werden können. Prusiner leitete daraus die Existenz eines Spezies-spezifischen Faktors ab, den er „Protein X“ nannte. Dieser soll bevorzugt mit dem PrP der eigenen Spezies interagieren und für die Konvertierung benötigt werden. In der transgenen Maus konkurriert Maus-PrP^c mit humanem PrP^c um die Bindung an dieses Protein, das jedoch bevorzugt an murines PrP^c bindet, so daß es zu keiner Umwandlung von humanem PrP^c kommen kann. Erst wenn der Bindungspartner Maus-PrP^c ausgeschaltet ist, kann das Protein X an das weniger bevorzugte humane PrP^c binden und dieses, unterstützt durch humanes PrP^{sc}, konvertieren.

Das bisher noch nicht identifizierte Protein X könnte als molekulares Chaperon fungieren, das die Aktivierungsenergie für die Umfaltung von PrP erniedrigt und damit den Konvertierungsprozeß beschleunigt. Molekulare Chaperone sind hochkonservierte Eiweißstoffe, die an der Faltung von Proteinen in der Zelle beteiligt sind.^[132] Überraschend fand man ausgerechnet in der Hefe einen Modellorganismus für Wechselwirkungen von Chaperonen mit Prion-artigen Proteinen. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert zwar kein Prion-Protein, dennoch gibt es zwei genetische Elemente, die sich ohne Beteili-

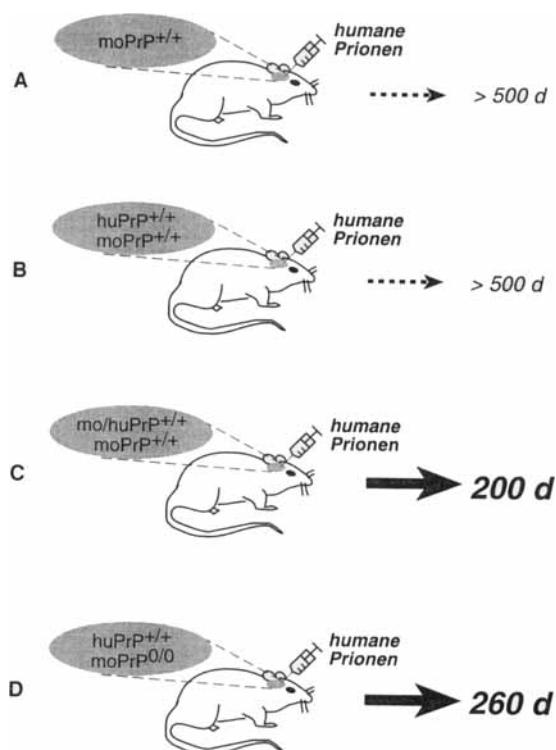


Abb. 14. Inokulationsversuche mit transgenen Mäusen unter Verwendung von humanen Prionen. In den Gehirne repräsentierenden Ellipsen ist der Genotyp der transgenen Maus symbolisiert: moPrP = Maus-PrP, huPrP = Mensch-PrP, mo/huPrP = chimäres PrP aus AS 96–167 vom Menschen sowie N- und C-Terminus von der Maus. A) Zwischen Mensch und Maus existiert eine hohe Spezies-Barriere; die meisten Tiere überleben die Inokulation mit humanen Prionen mehr als 500 Tage. B) Die Einführung von humanem PrP führt nicht zur Überwindung der Spezies-Barriere. C) Bei Verwendung eines chimären Transgens ist eine Infektion der Maus mit menschlichem Prion-Material möglich. D) Mäuse, die transgen für humanes PrP sind und deren Maus-PrP über „Knock-out“-Techniken ausgeschaltet wurden, lassen sich ebenfalls infizieren. (Abbildung basierend auf Daten aus Lit.[81, 82].)

gung von Nucleinsäuren in ihr vermehren können: [URE3] und [PSI⁺].^[133] [PSI⁺] ist ein Prion-artiges Aggregat des zellulären Hefeproteins Sup 35. Es konnte gezeigt werden, daß sich [PSI⁺] in der Hefe in Abhängigkeit von einem Chaperon (Hsp104) repliziert.^[134] Bereits vorhandenes [PSI⁺] induziert auch die Aggregation von neu synthetisiertem Sup 35.^[135] Man versucht, diese Ergebnisse auf die Prion-Vermehrung bei Säugetieren zu übertragen. Tatsächlich wurde mit Hilfe der „Two-Hybrid“-Technik eine Interaktion von Hamster-PrP^c mit einem molekularen Chaperon (Hsp 60) entdeckt.^[136] Versuche mit Scrapie-infizierten Neuroblastomzellen in Zellkultur deuten darauf hin, daß „chemische Chaperone“ (z. B. Dimethylsulfoxid oder Glycerin) die Bildung von PrP^{sc} beeinflussen.^[137] Der endgültige Nachweis, daß eine direkte Interaktion von PrP mit molekularen Chaperonen in die Pathogenese von TSEs in Säugetieren involviert ist, steht allerdings noch aus.

5.3. Prion-knock-out-Mäuse

5.3.1. PrP^c ist notwendig für eine Infektion mit Scrapie

Die Herstellung einer Mauslinie, in der das *Prn-p*-Gen ausgeschaltet ist, war in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen

versprach man sich Hinweise auf die normale biologische Funktion von PrP^c: Ein spezifischer Defekt der PrP^{0/0}-Maus könnte Rückschlüsse auf die Rolle des fehlenden Prion-Proteins zulassen. Zum anderen hätte man die Möglichkeit, die Protein-only-Hypothese zu überprüfen. Denn eine wichtige Konsequenz dieser Hypothese ist, daß beim Fehlen des wirtseigenen PrP^c keine Vermehrung von PrP^{Sc} möglich sein kann und die PrP^{0/0}-Maus damit resistent gegenüber einer Infektion mit PrP^{Sc} sein müßte. Tatsächlich ist die in der Arbeitsgruppe von Weissmann hergestellte *Prn-p*^{0/0}-Mauslinie gegenüber einer Scrapie-Infektion nicht suszeptibel, während Wildtyp-Mäuse unter gleichen Bedingungen durchschnittlich 140 Tage nach der Inokulation erkranken und sterben.^[33] Bei heterozygoten *Prn-p*^{0/+}-Mäusen ist die Inkubationszeit auf ca. 290 Tage verlängert, diese Tiere sind also gegen Scrapie-Infektionen partiell geschützt. Die Inkubationszeit korreliert demnach mit der Menge an PrP^c, die im Gehirn der Maus exprimiert wird. Ein wichtiges Kontrollexperiment bestätigte diese Ergebnisse: Die Rekonstitution des *Prn-p*-Gens in *Prn-p*^{0/0}-Mäusen führte zur Wiederherstellung der Suszeptibilität für Scrapie. Durch Einführen mehrerer Kopien des *Prn-p*-Gens gelangte man sogar zu einer Mauslinie, die PrP^c überexprimiert und erwartungsgemäß noch anfälliger für eine Scrapie-Infektion war. Bei diesen Mäusen war die Inkubationszeit gegenüber der der Wildtyp-Maus stark verkürzt (60 Tage).^[63]

In einer Zusammenarbeit von Aguzzi und Weissmann wurde das Prion-Protein nach einer weiteren Methode wieder in Knock-out-Mäuse eingeführt.^[138] Dabei wurde Hirngewebe von PrP^c-überexprimierenden Mäusen in Prion-knock-out-Mäuse transplantiert. Bei Infektionsstudien mit den so erhaltenen Mäusen ließen sich nach intracerebraler Inokulation mit Scrapie-Proben in den Transplantaten hohe PrP^{Sc}-Mengen und Infektiosität sowie weitere für TSEs charakteristische pathologische Veränderungen nachweisen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß meßbare PrP^{Sc}-Mengen vom Transplantat in das Gehirn des Wirtes gelangt waren. Dennoch konnten keine pathologischen Veränderungen des PrP-defizienten Gewebes beobachtet werden – auch nicht in unmittelbarer Umgebung des Transplantats. Die Autoren folgern daraus, daß exogenes PrP^{Sc} nicht zu einer Schädigung des Hirngewebes führt. Dagegen wirkt das PrP-Fragment AS106–126 auf *in vitro* kultivierte Neuronen toxisch.^[139] Im Labor von Hans Kretzschmar wurde dieser neurotoxische Effekt eingehend untersucht.^[140] So wurde gezeigt, daß Nervenzellen von Prion-null-Mäusen in Gegenwart von PrP106–126 nicht absterben. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, daß das Vorhandensein von PrP^c für die Pathogenese von Prion-Krankheiten wichtig ist.

5.3.2. Biologische Funktion von PrP^c

Die Herstellung von Knock-out-Mauszelllinien hat sich als sehr wirkungsvolles Mittel erwiesen, um die unbekannte biologische Funktion eines Proteins aufzuklären.^[141] Leider ist die Beziehung zwischen Ursache (ausgeschaltetes Gen) und Wirkung (Phänotyp) oft nicht eindeutig. Genau dieser Fall scheint momentan in der Prion-Forschung vorzuliegen. Die von der Weissmann-Gruppe vorgestellte PrP-knock-out-Maus entwickelt sich bis zu einem Alter von zwei Jahren vollkommen normal und zeigt keine Verhaltensauffälligkeiten oder neurologischen Fehlfunktionen.^[33, 142] Bei elektrophysiologischen Untersu-

chungen entdeckten Collinge und Mitarbeiter jedoch neuronale Defekte der synaptischen GABA_A-Rezeptor-Inhibierung^[36] (GABA = γ -Aminobuttersäure ist ein Neurotransmitter). Diese Beobachtung könnte zwar die pathologischen Effekte durch den Verlust von funktionellem PrP^c erklären, konnte aber von einer anderen Forschergruppe nicht befriedigend reproduziert werden.^[143] Der Grund für derartige Abweichungen in der Beobachtung eines Phänotyps könnte der unterschiedliche genetische Hintergrund der verwendeten Mausstämme sein. Auf das Abschalten eines bestimmten Proteins können Spezies nämlich mit verstärkter Expression anderer Proteine reagieren, wodurch der Knock-out unter Umständen wieder kompensiert wird. Für derartige Kompensationseffekte spielt der genetische Hintergrund des Organismus eine entscheidende Rolle. Verschiedene Mauslinien können daher auf das Abschalten der PrP-Expression unterschiedlich reagieren,^[144] wodurch die beobachteten Discrepanzen erklärt wären.

Darüber hinaus kann noch ein weiterer Effekt zum Tragen kommen. Es gibt inzwischen drei Forschergruppen, die von unterschiedlichen Phänotypen bei PrP-knock-out-Mäusen berichten. Jede dieser Knock-out-Linien wurde mit einem anderen molekularbiologischen „Targeting“-Verfahren hergestellt. Dadurch ergaben sich feine Unterschiede im Genom der Knock-out-Mäuse im Bereich des ausgeschalteten Gens, die ebenfalls die beobachteten Abweichungen bei den Phänotypen erklären könnten. So wurde dem Mausstamm aus dem Weissmann-Labor aus methodischen Gründen ein Teil des PrP-codierenden Gens belassen. Eine japanische Gruppe hingegen inaktivierte das gesamte *Prn-p*-Gen und berichtete von massiven Verhaltens- und neuropathologischen Störungen bei dieser Mauslinie.^[37] Diese Mäuse sind im Gegensatz zum Wildtyp unfähig, einer geraden Linie zu folgen. Die Ursache dafür scheint der Verlust von Purkinje-Zellen im Kleinhirn zu sein. Diese Zellen exprimieren große Mengen PrP und nutzen GABA als Neurotransmitter – eine mögliche Verbindung zu den Resultaten der Collinge-Gruppe. Tobler und Mitarbeiter beobachteten vor kurzem einen veränderten circadianen Rhythmus und Schlafstörungen bei PrP-defizienten Mäusen.^[38] Dieser Phänotyp ist insofern interessant, als er den Symptomen der menschlichen FFI gleicht (vgl. Abschnitt 4.3). Auch hier besteht ein möglicher Zusammenhang mit GABA, da deren Rezeptoren vermutlich an der Regulation des circadianen Rhythmus beteiligt sind.^[145] Um die Spezifität zu bestätigen, müßten die beobachteten Effekte durch Expression von PrP^c aufgehoben werden. Ferner müßten isogene Mäuse, d. h. solche mit gleichem genetischem Hintergrund, zur Herstellung der Knock-out-Linien herangezogen werden. Es bleibt daher abzuwarten, ob für den einen oder anderen vielversprechenden Ansatz eine klare Ursache-Wirkungs-Beziehung erstellt werden kann. Da physiologische Wirkungen in den meisten Fällen über Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt werden, könnte sich das Studium der Interaktion von PrP mit anderen zellulären Proteinen als sehr hilfreich erweisen.

6. Offene Fragen

Nach bisherigen Erkenntnissen handelt es sich bei dem Erreger der übertragbaren spongiformen Encephalopathien (TSEs) um ein Protein, das für seine Infektiosität und Vermehrung kei-

ne Nucleinsäure benötigt. Der Beweis der Protein-only-Hypothese durch die De-novo-Generierung von Infektiosität in vitro nach der Inkubation von PrP^c mit PrP^{Sc} steht noch aus. Die Umwandlung von wirteigenem PrP^c in pathogenes PrP^{Sc} scheint der zentrale Prozeß der Erkrankung an TSEs zu sein. An diesem Vorgang sind möglicherweise weitere, bisher nicht identifizierte Cofaktoren beteiligt, etwa ein „Prion-Rezeptor“ oder andere Proteine oder Moleküle, mit denen das Prion-Protein in Wechselwirkung tritt. Es ist deshalb wichtig, potentielle Prion-Protein-Interaktoren zu identifizieren und ihre mögliche Beteiligung an der Umwandlung von zellulärem PrP in die Scrapie-Isoform zu untersuchen.

Die beiden Isoformen des Prion-Proteins unterscheiden sich CD- und IR-spektroskopisch lediglich in ihrer Konformation. Ob sich verschiedene Prion-Stämme innerhalb einer Spezies in der dreidimensionalen Struktur unterscheiden, ist unklar, muß nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand aber postuliert werden, wenn man bestimmte stammspezifische Charakteristika der Prion-Vermehrung erklären will. Studien zur Struktur stehen also im Mittelpunkt der Untersuchungen zum Mechanismus der Prion-Replikation. Die durch NMR-Spektroskopie aufgeklärte Struktur eines Maus- PrP^c -Fragments zeigt die erwarteten ausgedehnten α -helicalen Bereiche neben zwei kleinen antiparallelen β -Faltblättern, die als Keim für die Bildung der β -Faltblattstrukturen von PrP^{Sc} dienen könnten. Ob die Struktur des N-terminal verkürzten Fragments jedoch alle für die Prion-Replikation wichtigen Bereiche enthält, muß noch gezeigt werden. Auch Strukturuntersuchungen zu PrP^{Sc} , die wegen dessen Schwerlöslichkeit problematisch sind, stehen noch aus.

Die zellfreie In-vitro-Konvertierung von Proteinase-K-sensitivem PrP^c in Proteinase-K-resistentes Proteinmaterial ist – vor allem im Hinblick auf die derzeit gängigen Modelle zur Prion-Vermehrung – ein wichtiger Schritt in der Prion-Forschung. Die Konvertierung erfolgt zwar stammspezifisch, allerdings vergleichsweise ineffektiv und gelingt bislang nur mit einem Überschuß an PrP^{Sc} . Ob das in vitro umgewandelte Material nicht nur Proteinase-K-resistent, sondern auch infektiös ist, wurde bis heute nicht geklärt. Die Antwort auf diese Frage ist aber für die Überprüfung der gegenwärtigen Hypothesen zur Prion-Vermehrung äußerst relevant.

PrP-knock-out-Mäuse sind für TSEs nicht suszeptibel und haben sonst keinen auffälligen Phänotyp. Das Prion-Protein selbst scheint also für den Organismus nicht von Nutzen zu sein, allerdings sind die Beobachtungen an drei unterschiedlichen PrP-knock-out-Zelllinien widersprüchlich. Möglicherweise ist PrP^c an synaptischen Prozessen beteiligt. Der Nachweis von PrP-Protein-Wechselwirkungen könnte hierbei funktionelle Zusammenhänge erkennen lassen. Die Übertragung von TSEs wird durch Spezies-Barrieren erschwert, die sich z. B. in verlängerten Inkubationszeiten manifestieren. Die Ursache hierfür wird in den leicht differierenden Aminosäuresequenzen und daraus resultierenden Strukturunterschieden der Prion-Proteine einzelner Spezies gesehen. Die zentrale Frage, ob BSE vom Rind auf den Menschen übertragen werden kann, entzieht sich der direkten Untersuchung. Allerdings lassen sich Makaken-Affen mit infektiösem BSE-Material unter Bildung zuvor nicht beobachteter histologischer Charakteristika infizieren. Diese neuartigen pathologischen Veränderungen scheinen mit denen identisch zu sein, die mit einer erst in jüngster Zeit hauptsächlich in

Großbritannien aufgetretenen neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) beim Menschen einhergehen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der BSE-Epidemie und dieser neuen Form von TSE beim Menschen ist daher wahrscheinlich.

7. Schlußbemerkungen

“It struck me recently that one should really consider the sequence of a protein molecule, about to fold into a precise geometric form, as a line of melody written in canon form and so designed by Nature to fold back upon itself, creating harmonic chords of interaction consistent with biological function. One might carry the analogy further by suggesting that the kinds of chords formed in a protein with scrambled disulfide bridges [...] are dissonant, but that, by giving an opportunity for rearrangement [...] they modulate to give the pleasing harmonics of the native molecule. Whether or not some conclusion can be drawn about the greater thermodynamic stability of Mozart’s over Schönberg’s music is something I will leave to the philosophers of the audience.”

C. B. Anfinsen in *New Perspectives in Biology* (Hrsg.: M. Sela), Elsevier, New York, 1964, S. 42–50.

In Anfinsens visionäre Welt des harmonischen Einklangs von Sequenz und Struktur der Proteine sind nicht erst durch die Erkenntnisse der Prion-Forschung dissonante Zwischentöne eingedrungen. So zeigen Experimente, die mit dem denaturierten Enzym „Rubisco“ (Ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase) durchgeführt wurden, daß eine spontane Renaturierung in die korrekte Struktur bei Verdünnung mit dem Renaturierungspuffer nicht ohne weiteres möglich ist. Die richtige Rückfaltung kann nur in Gegenwart des Chaperonins GroEL erreicht werden.^[146] Citrat-Synthetase aus Schweineherz-Mitochondrien wiederum neigt zur Selbstaggregation, wenn das Enzym in Guanidiniumhydrochlorid-Lösung denaturiert und dann wieder verdünnt wird.^[147] Diese und weitere Beispiele zeigen, daß nicht alle Proteine spontan in die thermodynamisch stabilste Konformation falten, etwa weil sie im Verlauf ihrer Faltung in eine kinetische Falle geraten. Solche Proteine falten also durchaus im Anfinsenschen Sinne, aber nur innerhalb eines schützenden Behälters.^[148]

Beim Prion-Protein scheint die Situation anders zu sein – vorausgesetzt die Protein-only-Hypothese stimmt. Das Protein existiert in mindestens zwei, wenn nicht sogar mehreren metastabilen Strukturzuständen^[149] und ist damit der Prototyp eines strukturlabilen Proteins. Vergleichsweise geringfügige Auslöser, etwa eine einzelne Mutation im *Prn-p*-Gen, oder der Kontakt mit geringsten Mengen der falsch gefalteten Isoform führen zur Manifestation dieser Labilität in der Umfaltung der normalen Isoform. Der Wechsel von der einen Struktur in die andere ist mit drastischen Konsequenzen für den Organismus verbunden.

Der Zuwachs an Wissen über Prionen und ihre Eigenschaften ist rasant – dieser Aufsatz beschreibt die wichtigsten Fortschritte, die bis April 1997 erzielt worden sind (ein „Redaktionsschluß“, den wir uns selbst auferlegen mußten – bei der atemberaubenden Entwicklung des Forschungsgebiets könnten wir wahrscheinlich noch jetzt daran schreiben). Trotzdem ist man vom Verständnis der Funktion und der Eigenschaften dieses einerseits beängstigenden, andererseits faszinierenden Proteins noch weit entfernt.

Anhang 1. Glossar der wichtigsten Abkürzungen und medizinischen Ausdrücke.

Amyloid	pathologische Ablagerung von Proteinen
AS	Aminosäure(n)
BSE	bovine spongiforme Encephalopathie
CD	Circulardichroismus
Cerebrospinalflüssigkeit	auch Liquor; vom Gehirn abgesonderte, unter anderem im Rückenmark vorkommende lymphähnliche Flüssigkeit
Chaperone	Proteine, die an der Faltung von zellulären Proteinen beteiligt sind
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
EEG	Elektroenzephalogramm
FFI	fatale familiäre Insomnie
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gliazellen	Bindegewebszellen des zentralen Nervensystems
Gliose	pathologische Vermehrung von Gliazellen
GPI	Glycosylphosphatidylinosit
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
intracerebrale Inokulation	Infektion von Proben in das Kleinhirn von Versuchstieren
Octapeptidsequenz	für PrP charakteristisches, wiederkehrendes Motiv aus acht Glycin/Prolin-reichen AS
Polymorphismus	Abweichungen im Genotyp mit einer nicht allein auf die Mutationsraten zurückzuführenden Häufigkeit
Prion	Kurzform für proteinaceous infectious particle
PrP	Prion-Protein
PrP ²⁷⁻³⁰	Faktion von N-terminal verkürzten Prion-Proteinen, die bei der Elektrophorese eine Mobilität von 27–30 kD aufweisen
PrP ^c	zelluläre Isoform von PrP
PrP ^{Sc} , PrP ^{res}	pathogene Isoformen von PrP
Purkinje-Zellen	große Nervenzellen in der Kleinhirnrinde
Spongiosis	schwammartige Veränderung des Gewebes
TSE	transmissible spongiform encephalopathy

Wir danken den Mitgliedern der Prion-Gruppe, D. Proske und R. Rieger, für viele wertvolle Diskussionen und H. Schätzl für die kritische Durchsicht des Manuskripts und seine hilfreichen Anregungen. Ferner danken wir R. Glockshuber und K. Wüthrich für die Abbildung der PrP-NMR-Struktur, J. Ironside und H. Kretzschmar für die Abbildungen der histologischen Dünnschnitte sowie H. Kretzschmar und G. Ourisson für wertvolle Hinweise. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Bildung, Forschung, Wissenschaft und Technologie (BMBF) danken wir für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 11. Februar 1997 [A 210]

- [1] A. F. Hollemann, E. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 81.–90. Aufl., DeGruyter, Berlin, 1976.
- [2] S. B. Prusiner, *Science* **1982**, *216*, 136–144.
- [3] S. B. Prusiner, M. P. McKinley, K. A. Bowman, D. C. Bolton, P. E. Bendheim, D. F. Groth, G. G. Glenner, *Cell* **1983**, *35*, 349–358.
- [4] J. Hope, L. J. D. Morton, C. F. Farquhar, G. Multhaup, K. Beyreuther, R. H. Kimberlin, *EMBO J.* **1986**, *5*, 2591–2597.
- [5] D. Westaway, G. A. Carlson, S. B. Prusiner, *Tr. Microbiol.* **1995**, *3*, 141–147.
- [6] L. J. Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 429–432.
- [7] G. W. Roberts, J. Clinton in *Prion Disease: The Spectrum of Pathology and Diagnostic Considerations* (Hrsg.: S. B. Prusiner, J. Collinge, J. Powell, B. Anderton), Ellis Horwood, New York, 1992.
- [8] C. I. Lasmézas, J. P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, J. J. Hauw, D. Dormont, *J. Gen. Virol.* **1996**, *77*, 1601–1609.
- [9] M. E. Bruce, *Br. Med. Bull.* **1993**, *49*, 822–838.
- [10] Dieses Phänomen kennt man von viralen Erregern: Als Folge von Mutationen im viralen Genom ändern sich die pathologischen Eigenschaften, während die prinzipielle Infektiosität erhalten bleibt.
- [11] H. Diringer in *Spongiforme Encephalopathien bei Tieren unter besonderer Berücksichtigung der BSE*, Band 75 (Hrsg.: W. Köhler), Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle, 1996, S. 26–28. Diringer äußerte sich zu seiner Hypothese auch in einer Podiumsdiskussion der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, die von Prof. Rudolf Rott moderiert wurde.
- [12] M. Öznel, H. Diringer, *Lancet* **1994**, *343*, 894–895.
- [13] M. Öznel, Y.-G. Xi, E. Baldauf, H. Diringer, M. Poccetti, *Lancet* **1994**, *344*, 923–924.
- [14] I. Tischer, H. Gelderblom, W. Vettermann, M. A. Koch, *Nature* **1982**, *295*, 64–66.
- [15] T. O. Diener, R. A. Owens, R. W. Hammond, *Intervirology* **1993**, *35*, 186–195.
- [16] T. O. Diener, *FASEB J.* **1991**, *5*, 2808–2813.
- [17] D. Riesner, M. Colpan, T. C. Goodman, L. Nagel, J. Schumacher, G. Steger, H. Hofmann, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1983**, *1*, 669–688.
- [18] J. Smarda, *Acta Virol. Engl. Ed.* **1987**, *31*, 506–524.
- [19] T. O. Diener, *Tr. Microbiol.* **1993**, *1*, 289–294.
- [20] K. Kellings, N. Meyer, C. Mirenda, S. B. Prusiner, D. Riesner, *J. Gen. Virol.* **1992**, *73*, 1025–1029.
- [21] K. Kellings, S. B. Prusiner, D. Riesner, *Philos. Trans. R. Soc. London B* **1994**, *343*, 425–430.
- [22] S. B. Prusiner, *Science* **1991**, *252*, 1515–1522.
- [23] N. Meyer, V. Rosenbaum, B. Schmidt, K. Gilles, C. Mirenda, D. Groth, S. B. Prusiner, D. Riesner, *J. Gen. Virol.* **1991**, *72*, 37–49.
- [24] R. Mestel, *Science* **1996**, *273*, 184–189.
- [25] T. Alper, D. A. Haig, M. C. Clarke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, *22*, 278–284.
- [26] T. Alper, W. A. Cramp, D. A. Haig, M. C. Clarke, *Nature* **1967**, *214*, 764–766.
- [27] J. S. Griffith, *Nature* **1967**, *215*, 1043–1044.
- [28] D. C. Bolton, M. P. McKinley, S. B. Prusiner, *Science* **1982**, *218*, 1309–1311.
- [29] E. Turk, D. B. Teplow, L. E. Hood, S. B. Prusiner, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *176*, 21–30.
- [30] „Prion“ entsteht durch eine leichte Veränderung aus dem eigentlich aus der englischen Bezeichnung abgeleiteten Kürzel „Proin“.
- [31] B. Oesch, D. Westaway, M. Wälchli, M. P. McKinley, S. B. H. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood, S. B. Prusiner, C. Weissmann, *Cell* **1985**, *40*, 735–746.
- [32] K. Basler, B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Wälchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner, C. Weissmann, *Cell* **1986**, *46*, 417–428.
- [33] H. Buehler, A. Aguzzi, A. Sailer, R.-A. Greiner, P. Autenrieth, M. Aguet, C. Weissmann, *Cell* **1993**, *73*, 1339–1347.
- [34] C. B. Anfinsen, *Science* **1973**, *181*, 223–230.
- [35] C. I. Lasmézas, J.-P. Deslys, O. Robain, A. Jaegly, V. Beringue, J.-M. Peyrin, J.-G. Fournier, J.-J. Hauw, J. Rossier, D. Dormont, *Science* **1997**, *275*, 402–405.
- [36] J. Collinge, M. A. Whittington, K. C. L. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke, J. G. R. Jeffreys, *Nature* **1994**, *370*, 295–297.
- [37] S. Sakaguchi, S. Katanine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, H. Okada, S. Hasegawa, T. Miyamoto, T. Noda, *Nature* **1996**, *380*, 528–531.
- [38] I. Tobler, S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride, J. C. Manson, *Nature* **1996**, *380*, 639–642.
- [39] N. Stahl, D. R. Borchelt, K. Hsiao, S. B. Prusiner, *Cell* **1987**, *51*, 229–240.
- [40] D. C. Bolton, R. K. Meyer, S. B. Prusiner, *J. Virol.* **1985**, *53*, 596–606.
- [41] L. Manuelidis, S. Valley, E. E. Manuelidis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4263–4267.
- [42] T. Endo, D. Groth, S. B. Prusiner, A. Kobata, *Biochemistry* **1989**, *28*, 8380–8388.
- [43] J. Safar, W. Wang, M. P. Padgett, M. Ceroni, P. Piccardo, D. Zopf, D. C. Gajdusek, C. J. J. Gibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6373–6377.
- [44] R. A. Gibbons, G. D. Hunter, *Nature* **1967**, *215*, 1041–1043.
- [45] R. K. Meyer, M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry, S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 2310–2314.
- [46] B. Caughey, G. J. Raymond, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 18217–18223.
- [47] B. Chesebro, R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, K. Robbins, L. Mayer, J. M. Keith, C. Garon, A. Haase, *Nature* **1985**, *315*, 331–333.
- [48] C. Locht, B. Chesebro, R. Race, J. M. Keith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 6372–6376.
- [49] B. Caughey, *Br. Med. Bull.* **1993**, *49*, 860–872.
- [50] D. Riesner, K. Kellings, K. Post, H. Wille, H. Serban, D. Groth, M. A. Baldwin, S. B. Prusiner, *J. Virol.* **1996**, *70*, 1714–1722.
- [51] F. E. Cohen, K.-M. Pan, Z. Huang, M. Baldwin, R. J. Fletterick, S. B. Prusiner, *Science* **1994**, *264*, 530–531.
- [52] K.-M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10962–10966.
- [53] B. W. Caughey, A. Dong, K. S. Bhat, D. Ernst, S. F. Hayes, W. S. Caughey, *Biochemistry* **1991**, *31*, 7672–7680.
- [54] N. Stahl, M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlingame, S. B. Prusiner, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1991–2002.
- [55] J. Safar, P. P. Roller, D. C. Gajdusek, C. J. Gibbs, Jr., *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 20276–20284.

- [56] Z. Huang, J.-M. Gabriel, M. A. Baldwin, R. J. Fletterick, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7139–7143.
- [57] Z. Huang, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, *Fold. Design* **1995**, *1*, 13–19.
- [58] M. Gasset, M. A. Baldwin, D. Lloyd, J. M. Gabriel, D. M. Holtzmann, F. E. Cohen, R. J. Fletterick, S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10940–10944.
- [59] J. T. Nguyen, M. A. Baldwin, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4186–4192.
- [60] H. Zhang, K. Kaneko, J. T. Nguyen, T. L. Livshits, M. A. Baldwin, F. E. Cohen, T. L. James, S. B. Prusiner, *J. Mol. Biol.* **1995**, *250*, 514–526.
- [61] R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, K. Wüthrich, *Nature* **1996**, *382*, 180–182.
- [62] S. Hornemann, R. Glockshuber, *J. Mol. Biol.* **1996**, *262*, 614–619.
- [63] M. Fischer, T. Rülicke, A. Raeber, A. Sailer, M. Moser, B. Oesch, S. Brandner, A. Aguzzi, C. Weissmann, *EMBO J.* **1996**, *15*, 1255–1264.
- [64] S. Prusiner, *Arch. Neurol.* **1993**, *50*, 1129–1153.
- [65] Ein möglicher Weg zu markiertem PrP^{Sc} wäre z. B. die In-vitro-Konvertierung von ¹³C- und ¹⁵N-markiertem PrP^C. Bei der In-vitro- oder auch zellfreien Konvertierung wird PrP^C durch Zugabe von exogenem PrP^{Sc} in PrP^{Sc} umgewandelt.
- [66] J. Heller, A. C. Kolbert, R. Larsen, M. Ernst, T. Bekker, M. Baldwin, S. B. Prusiner, A. Pines, D. E. Wemmer, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1655–1661.
- [67] M. E. Bruce, A. G. Dickinson, *J. Gen. Virol.* **1987**, *68*, 79–89.
- [68] R. H. Kimberlin, C. A. Walker, H. Fraser, *J. Gen. Virol.* **1989**, *70*, 2017–2025.
- [69] R. I. Carp, S. M. Callahan, *J. Gen. Virol.* **1991**, *72*, 293–298.
- [70] R. Hecker, A. Taraboulos, M. Scott, K. M. Pan, S. L. Yang, M. Torchia, K. Jendroska, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, *Genes Dev.* **1992**, *6*, 1213–1228.
- [71] P. Brown, P. P. Liberski, A. Wolff, D. C. Gajdusek, *J. Infect. Dis.* **1990**, *161*, 467–472.
- [72] J. H. Come, P. E. Fraser, P. T. Lansbury, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5959–5963.
- [73] T. T. Ashburn, P. T. Lansbury, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11012–11013.
- [74] P. T. Lansbury, Jr., B. Caughey, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 1–5.
- [75] M. Eigen, *Biophys. Chem.* **1996**, *63*, A1–A18.
- [76] A. J. Raeber, D. R. Borchelt, M. Scott, S. B. Prusiner, *J. Virol.* **1992**, *66*, 6155–6163.
- [77] D. A. Kocisko, J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury, B. Caughey, *Nature* **1994**, *370*, 471–474.
- [78] R. A. Bessen, D. A. Kocisko, G. J. Raymond, S. Nandan, P. T. Lansbury, B. Caughey, *Nature* **1995**, *375*, 698–700.
- [79] R. A. Bessen, R. F. Marsh, *J. Virol.* **1994**, *68*, 7859–7868.
- [80] G. C. Telling, P. Parchi, S. J. DeArmond, P. Cortelli, P. Montagna, R. Gabizon, J. Mastrianni, E. Lugarési, P. Gambetti, S. B. Prusiner, *Science* **1996**, *274*, 2079–2082.
- [81] G. C. Telling, M. Scott, K. K. Hsiao, D. Foster, S.-L. Yang, M. Torchia, K. C. L. Sidle, J. Collinge, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9936–9940.
- [82] G. C. Telling, M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, *Cell* **1995**, *83*, 79–90.
- [83] L. E. Orgel, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 413–414.
- [84] D. K. Kondopudi, R. J. Kaufman, N. Singh, *Science* **1990**, *250*, 975–976.
- [85] W. J. Hadlow, *Lancet* **1957**, *2*, 289–290.
- [86] D. C. Gajdusek, C. J. J. Gibbs, M. Alpers, *Science* **1967**, *155*, 212–214.
- [87] J. Cuillé, P. L. Chelle, C. R. *Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D* **1939**, *208*, 1058–1060.
- [88] Erste Berichte über eine mögliche Scrapie-Form beim Rind reichen in das 19. Jahrhundert zurück [151].
- [89] J. Hope, L. J. Reekie, N. Hunter, G. Multhaup, K. Beyreuther, H. White, A. C. Scott, M. J. Stack, M. Dawson, G. A. Wells, *Nature* **1988**, *336*, 390–392.
- [90] R. M. Anderson, C. A. Donnelly, N. M. Ferguson, M. E. J. Woolhouse, C. J. Watt, H. J. Udy, S. M. MaWhinney, S. P. Dunstan, T. R. E. Southwood, J. W. Wilesmith, J. B. M. Ryan, L. J. Hoinville, J. E. Hillerton, A. R. Austin, G. A. H. Wells, *Nature* **1996**, *382*, 779–788.
- [91] J. W. Wilesmith, J. B. M. Ryan, M. J. Atkinson, *Vet. Rec.* **1991**, *128*, 199–203.
- [92] J. W. Wilesmith, J. B. M. Ryan, W. D. Hueston, L. J. Hoinville, *Vet. Rec.* **1992**, *130*, 90–94.
- [93] J. Bradbury, *Lancet* **1996**, *348*, 393.
- [94] H.-G. Creutzfeldt, *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* **1920**, *57*, 1–18.
- [95] A. Jakob, *Dtsch. Z. Nervenheilkd.* **1921**, *70*, 132–146.
- [96] J. Gerstmann, E. Sträussler, I. Scheinker, *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* **1936**, *154*, 736–762.
- [97] R. Medori, H.-J. Tritschler, A. LeBlanc, F. Villare, V. Manetto, H. Y. Chen, R. Xue, S. Leal, P. Montagna, P. Cortelli, P. Tinuper, P. Avoni, M. Mochi, A. Baruzzi, J. J. Hauw, J. Ott, E. Lugarési, L. Autiño-Gambetti, P. Gambetti, *New Eng. J. Med.* **1992**, *326*, 444–449.
- [98] S. B. Prusiner, *Sci. Am.* **1995**, *272*(1), 48–57.
- [99] C. Masson, I. Delalande, J. P. Deslys, D. Henin, C. Fallet-Banco, D. Dormont, D. Ley, *Neurology* **1994**, *44*, 179–180.
- [100] A. Jaegly, F. Boussin, J. P. Deslys, D. Dormont, *Genomics* **1995**, *27*, 382–383.
- [101] H. A. Kretzschmar, M. Neumann, D. Stavrou, *Acta Neuropathol.* **1995**, *89*, 96–98.
- [102] J. Collinge, M. S. Palmer, A. J. Dryden, *Lancet* **1991**, *337*, 1441–1442.
- [103] L. G. Goldfarb, R. B. Petersen, M. Tabaton, P. Brown, A. C. LeBlanc, P. Montagna, P. Cortelli, J. Julien, C. Vital, W. W. Pendelbury, M. Haltia, P. R. Wills, J. J. Hauw, P. E. McKeever, L. Monari, B. Schrank, G. D. Szwedlow, L. Autiño-Gambetti, D. C. Gajdusek, E. Lugarési, P. Gambetti, *Science* **1992**, *258*, 806–808.
- [104] L. G. Goldfarb, P. Brown, M. Haltia, F. Cathala, W. R. McCombie, J. Kovánen, L. Cervenakova, L. Goldin, A. Nieto, M. S. Godec, D. M. Asher, D. C. Gajdusek, *Ann. Neurol.* **1992**, *31*, 274–281.
- [105] P. Gambetti, R. Petersen, L. Monari, M. Tabaton, L. Autiño-Gambetti, *Br. Med. Bull.* **1993**, *49*, 980–994.
- [106] L. Monari, S. G. Chen, P. Brown, P. Parchi, R. B. Petersen, J. Mikol, F. Gray, P. Cortelli, P. Montagna, B. Ghetti, L. G. Goldfarb, D. C. Gajdusek, E. Lugarési, P. Gambetti, L. Autiño-Gambetti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2839–2842.
- [107] K. Hsiao, H. F. Baker, T. J. Crow, M. Poulter, F. Owen, J. D. Terwilliger, D. Westaway, J. Ott, S. B. Prusiner, *Nature* **1989**, *338*, 342–345.
- [108] D. Goldgaber, L. G. Goldfarb, P. Brown, D. M. Asher, W. T. Brown, S. Lin, J. W. Teener, S. M. Feinstein, R. Rubenstein, R. J. Kascsak, J. W. Boelaard, D. C. Gajdusek, *Exp. Neurol.* **1989**, *106*, 204–206.
- [109] K. Doh-ura, J. Tateishi, H. Sasaki, T. Kitamoto, Y. Sakaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *163*, 974–979.
- [110] Y. Goldhammer, R. Gabizon, Z. Meiner, M. Sadeh, *Neurology* **1993**, *43*, 2718–2719.
- [111] T. Kitamoto, R. Iizuka, J. Tateishi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192*, 525–531.
- [112] B. Ghetti, P. Piccardo, M. G. Spillantini, Y. Ichimiya, M. Porro, F. Perini, T. Kitamoto, J. Tateishi, C. Seiler, B. Frangione, O. Bugiani, G. Giaccone, F. Prelli, M. Goedert, S. R. Dlouhy, F. Tagliavini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 744–748.
- [113] P. Belt, I. Muileman, B. Schreuder, J. Bos de Ruijter, A. Gielkens, M. Smits, *J. Gen. Virol.* **1995**, *76*, 509–517.
- [114] R. G. Will, J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Poccia, A. Hofman, P. G. Smith, *Lancet* **1996**, *347*, 921–925; diese Publikation hatte über ihre wissenschaftliche Wirkung hinaus (sie ist die im Jahr 1996 meistzitierte wissenschaftliche Arbeit überhaupt; Quelle: Institute for Scientific Information, Hot Papers Database, November/Dezember 1994–November/Dezember 1996) auch weitreichende politische Folgen: Die britische Regierung sah sich im Frühjahr 1996 erstmals genötigt zuzugeben, daß eine Übertragung von BSE auf den Menschen nicht auszuschließen ist. Auf europäischer Ebene reagierte man prompt mit einem Exportverbot für britisches Rindfleisch.
- [115] C. I. Lasmézas, J.-P. Deslys, R. Demalmay, K. T. Adjou, F. Lamoury, D. Dormont, O. Robain, J. Ironside, J.-J. Hauw, *Nature* **1996**, *381*, 743–744.
- [116] G. Chazot, E. Broussolle, C. I. Lapras, T. Blättler, A. Aguzzi, N. Kopp, *Lancet* **1996**, *347*, 1181.
- [117] J. Collinge, K. C. L. Sidle, J. Meads, J. Ironside, A. F. Hill, *Nature* **1996**, *383*, 685–690.
- [118] P. Parchi, S. Capellari, S. G. Chenn, R. B. Petersen, P. Gambetti, N. Kopp, P. Brown, T. Kitamoto, J. Tateishi, A. Giese, H. Kretzschmar, *Nature* **1997**, *386*, 232–233.
- [119] R. A. Somerville, A. Chong, O. U. Mulqueen, C. R. Birkett, S. C. E. R. Wood, J. Hope, *Nature* **1997**, *386*, 564.
- [120] N. Kopp, N. Streichenberger, J. Deslys, J. Laplanche, G. Chazot, *Lancet* **1996**, *348*, 1239–1240.
- [121] S. B. Prusiner, D. Groth, H. Serban, R. Koehler, D. Foster, M. Torchia, D. R. Burton, S. L. Yang, S. J. DeArmond, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10608–10612.
- [122] R. A. Williamson, D. Peretz, N. Smorodinsky, R. Bastidas, H. Serban, I. Mehlhorn, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7279–7282.
- [123] B. E. C. Schreuder, L. J. M. van Keulen, M. E. W. Vromans, J. P. M. Langenveld, M. A. Smits, *Nature* **1996**, *381*, 563.
- [124] A. F. Hill, M. Zeidler, J. Ironside, J. Collinge, *Lancet* **1997**, *349*, 99–100.
- [125] M. G. Harrington, C. R. Merrill, D. M. Asher, D. C. Gajdusek, *New Engl. J. Med.* **1986**, *315*, 279–283.
- [126] G. Hsich, K. Kenney, C. J. Gibbs, K. H. Lee, M. G. Harrington, *New Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 924–930.
- [127] K. K. Hsiao, M. Scott, D. Foster, D. F. Groth, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, *Science* **1990**, *250*, 1587–1590.
- [128] K. K. Hsiao, D. Groth, M. Scott, S. L. Yang, H. Serban, D. Rapp, D. Foster, M. Torchia, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9126–9130.
- [129] H. M. Schätzl, M. Da Costa, L. Taylor, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 362–374.
- [130] M. Scott, D. Foster, C. Mirenda, D. Serban, F. Coutal, M. Wälchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S. J. DeArmond, D. Westaway, S. B. Prusiner, *Cell* **1989**, *59*, 847–857.
- [131] S. B. Prusiner, M. Scott, D. Foster, K.-M. Pan, D. Groth, C. Mirenda, M. Torchia, S.-L. Yang, D. Serban, G. A. Carlson, P. C. Hoppe, D. Westaway, S. J. DeArmond, *Cell* **1990**, *63*, 673–686.

- [132] F. U. Hartl, J. Martin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 92–102.
- [133] R. B. Wickner, D. C. Masison, H. K. Edskes, *Yeast* **1995**, *11*, 1671–1685.
- [134] Y. O. Chernoff, S. L. Lindquist, B.-I. Ono, S. G. Inge-Vechtomov, S. W. Liebman, *Science* **1995**, *268*, 880–884.
- [135] M. M. Patino, J.-J. Liu, J. R. Glover, S. Lindquist, *Science* **1996**, *273*, 622–626.
- [136] F. Edenhofer, R. Rieger, M. Famulok, W. Wendler, S. Weiss, E.-L. Winnacker, *J. Virol.* **1996**, *70*, 4724–4728.
- [137] J. Tatzelt, S. B. Prusiner, W. J. Welch, *EMBO J.* **1996**, *15*, 6363–6373.
- [138] S. Brandner, S. Isenmann, A. Raeber, M. Fischer, A. Sailer, Y. Kobayashi, S. Marino, C. Weissmann, A. Aguzzi, *Nature* **1996**, *379*, 339–343.
- [139] G. Forloni, N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani, F. Tagliavini, *Nature* **1993**, *362*, 543–546.
- [140] D. R. Brown, J. Herms, H. A. Kretzschmar, *NeuroReport* **1994**, *5*, 2057–2060.
- [141] E. P. Brandon, R. L. Idzerda, G. S. McKnight, *Curr. Biol.* **1995**, *5*, 625–634.
- [142] H. Buehler, M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H.-P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, C. Weissmann, *Nature* **1992**, *356*, 577–582.
- [143] P.-M. Lledo, P. Tremblay, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, R. A. Nicoll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2403–2407.
- [144] D. R. Borchelt, S. S. Sisodia, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 619–621.
- [145] J. P. Estibeiro, *Trends Neurosci.* **1996**, *19*, 257–258.
- [146] P. Goloubinoff, J. P. Christeller, A. A. Gatenby, G. C. Lorimer, *Nature* **1989**, *371*, 578–586.
- [147] J. Buchner, M. Schmidt, M. Fuchs, R. Jaenicke, R. Rudolph, F. X. Schmid, T. Kieflhaber, *Biochemistry* **1991**, *30*, 1586–1591.
- [148] R. John Ellis nennt diesen Behälter auch bildhaft „Anfinsen-Käfig“ [152].
- [149] Zumindest gilt diese Aussage im Sinne der engen Definition von Prusiners Heterodimer-Modell.
- [150] C. Weissmann, *Nature* **1991**, *349*, 569–571.
- [151] M. Sarradet, *Rev. Vet.* **1883**, *3*, 310–312.
- [152] R. J. Ellis, *Fold. Design* **1995**, *1*, R9–R15.

Hinterlegen von Daten aus Röntgenstrukturanalysen

Um Autoren und Gutachtern das Leben zu erleichtern, haben das Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) und das Fachinformationszentrum Karlsruhe (FIZ) ihre Vorgehensweisen für das Hinterlegen von Daten zu Einkristall-Röntgenstrukturanalysen vereinheitlicht.

Bitte hinterlegen Sie deshalb Ihre Daten vor dem Einreichen Ihres Beitrags elektronisch bei der jeweils richtigen Datenbank, d. h. beim CCDC für organische und metallorganische Verbindungen und beim FIZ für anorganische Verbindungen. Beide Datenbanken geben Ihnen hier gerne Hilfestellung (siehe unsere *Hinweise für Autoren* im ersten Heft dieses Jahres). In der Regel wird Ihnen von dort innerhalb von zwei Arbeitstagen eine Hinterlegungsnummer mitgeteilt, die Sie bitte mit dem jeweiligen Standardtext (siehe *Hinweise für Autoren*) in Ihr Manuskript aufnehmen. Dies ermöglicht es Gutachtern, sich schnell und einfach die Strukturdaten zu besorgen, wenn sie Ihnen für die Urteilsfindung wichtig scheinen.

Dieses Verfahren wird einheitlich von den Redaktionen der Zeitschriften *Advanced Materials*, *Angewandte Chemie*, *Chemische Berichte/Recueil*, *Chemistry—A European Journal* und *Liebigs Annalen/Recueil* angewendet.